

ORSAY

Série A

N° d'ordre: 802

Inscrite aux archives du
centre de documentation
du CNRS sous le N° AO 5904

THÈSES

PRÉSENTÉES

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS SUD (XI)

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Paul PERSONNE

Maître Assistant

à la Faculté des Sciences de l'Université de Picardie

1ère Thèse:

*ÉTUDE STRUCTURALE ET CYTOCHIMIQUE
DE LA PIÈCE INTERMÉDIAIRE
DU SPERMATOZOÏDE DES GASTÉROPODES PULMONÉS:
CAS DE SPÉCIALISATION MITOCHONDRIALE*

2ème Thèse:

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

SOUTENUES LE 12 JUIN 1971, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M. ANDRE

: Président

M. VIVIER

Examineurs

M. FAVARD

ORSAY

Série A

N° d'ordre: 802

Inscrite aux archives du
centre de documentation
du CNRS sous le N° AO 5904

THÈSES

PRÉSENTÉES

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS SUD (XI)

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Paul PERSONNE

Maître Assistant

à la Faculté des Sciences de l'Université de Picardie

1ère Thèse:

**ÉTUDE STRUCTURALE ET CYTOCHIMIQUE
DE LA PIÈCE INTERMÉDIAIRE
DU SPERMATOZOÏDE DES GASTÉROPODES PULMONÉS :
CAS DE SPÉCIALISATION MITOCHONDRIALE**

2ème Thèse:

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

SOUTENUES LE 12 JUIN 1971, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M. ANDRE : Président

M. VIVIER

M. FAVARD

Examineurs



à la mémoire de
mon ami Claude Oger

à ma famille

AVANT - PROPOS

Il m'est très agréable de vous remercier, Monsieur le Professeur J. André de m'avoir confié ce travail et de m'avoir toujours si amicalement prodigué vos conseils et vos encouragements. C'est à votre enseignement et au bienveillant accueil de Monsieur le Docteur W. Bernhard que je dois ma formation de microscopiste électronique.

Je vous suis reconnaissant, Monsieur le Professeur E. Vivier pour la confiance que vous m'avez toujours témoignée. Je n'oublie pas que grâce à votre action et à celle du Doyen Marion, l'implantation d'un microscope électronique à la Faculté des Sciences d'Amiens a grandement facilité mes recherches.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur P. Favard qui m'a fait l'honneur de s'intéresser à mes recherches et a accepté de participer à mon jury de thèse.

Je remercie le Docteur Wegmann de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir initié aux techniques de l'histoenzymologie.

Je suis reconnaissant au Docteur Drochmans, à Monsieur le Professeur H. Clauser et à Monsieur le Professeur R. Joly, Doyen de la Faculté des Sciences d'Amiens, de m'avoir fait bénéficier de leurs critiques.

Monsieur le Professeur C. Mettetal, Chef du Département de Biologie Animale de la Faculté des Sciences d'Amiens m'a toujours apporté son soutien, je l'en remercie bien vivement.

Ce travail doit beaucoup à la collaboration dynamique de Winston Anderson que je remercie bien vivement.

Je n'oublie pas la contribution efficace de mes amis assistants et techniciens du Laboratoire de Biologie Animale de la Faculté des Sciences d'Amiens et du Laboratoire de Biologie Cellulaire 4 de la Faculté des Sciences d'Orsay. Je voudrais remercier plus particulièrement Mademoiselle Renée Charret qui, dans des conditions matérielles particulièrement critiques, facilita avec beaucoup de dévouement et de patience mes premiers contacts avec la vie de laboratoire, ainsi que Jacques Minard et Gérard Devauchelle qui ont complaisamment contribué à l'illustration de ce travail.

Je suis très redevable à Mademoiselle Françoise Bettembos de l'aide technique qu'elle m'a apportée, à Monsieur J.B. Zazac qui a effectué le travail photographique et à Madame Nicole Delatte qui a assuré la dactylographie de ce mémoire.

L'impression de ce travail a été effectuée par les soins de la Faculté des Sciences d'Amiens avec le concours de Madame Fallet et de Monsieur Douay que je remercie.

Ce travail a bénéficié de l'aide du Centre National de la Recherche Scientifique (ERA 174, ERA 184) et de la Direction des Recherches et des Moyens d'Essai (contrat 513/68).

S O M M A I R E

INTRODUCTION	1
1. MATERIEL ET TECHNIQUES	7
1.1. MATERIEL	7
1.2. TECHNIQUES	7
1.2.1. PREPARATIONS DES TISSUS POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	7
1.2.2. TECHNIQUES CYTOCHIMIQUES	7
1.2.2.1. Recherche des protéines et du glycogène par les techniques d'extraction enzymatique	8
1.2.2.2. Extraction chimique des lipides	8
1.2.2.3. Mise en évidence du glycogène par la réaction acide périodique thiosemicarbazide protéinate d'argent	9
1.2.3. TECHNIQUES CYTOENZYMOLOGIQUES	9
1.2.3.1. Les ATPases	11
1.2.3.2. La D-glucose-6-phosphate phosphohydrolase	11
1.2.3.3. Les déshydrogénases	11
1.2.3.4. La cytochrome c : oxygène oxydoréductase	12
1.2.3.5. L'amylophosphorylase et son système régulateur	13
2. ASPECT MORPHOLOGIQUE DE L'EVOLUTION MITOCHONDRIALE	15
2.1. HISTORIQUE	15
2.2. LES ETAPES DE L'EVOLUTION CHEZ <u>HELIX ASPERSA</u>	16
2.2.1. LE SPERMATOCYTE	16
2.2.2. LA SPERMATIDE	17
2.2.2.1. Stade 1	17
2.2.2.2. Stade 2	17
2.2.2.3. Stade 3	21
2.2.3. LE SPERMATOZOIDE	29
2.3. LE CHONDRIOME AU COURS DE LA SPERMATOGENESE	31
D'AUTRES PULMONES	
2.4. DISCUSSION	31
2.4.1. LA PSEUDOMATRICE	32
2.4.2. LA CRISTALLISATION ET LE CRISTAL	32
2.4.3. LES CONSTITUANTS MITOCHONDRIAUX FONDAMENTAUX	34
2.4.4. L'HELICE PRINCIPALE	35

3. ETUDE CYTOCHIMIQUE ET CYTOENZYMOLOGIQUE	37
3.1. RESULTATS	37
3.1.1. LES EXTRACTIONS ENZYMATIQUES	37
3.1.1.1. <i>Les protéases</i>	37
3.1.1.2. <i>Les amylases</i>	38
3.1.2. ACTION DU MELANGE DELIPIDANT METHANOL-CHLOROFORME	38
3.1.3. MISE EN EVIDENCE DU GLYCOGENE PAR LA REACTION ACIDE PERIODIQUE-THIOSEMICARBAZIDE-PROTEINATE D'ARGENT.	39
3.1.4. RECHERCHE DES DESHYDROGENASES	39
3.1.4.1. <i>Les déshydrogénases mitochondriales</i>	39
3.1.4.2. <i>Les enzymes glycolytiques : D-glycéraldehyde-3-phosphate</i> <i>NAD oxydoréductase (GAPD) et L-lactate : NAD</i> <i>oxydoréductase (LDH)</i>	40
3.1.4.3. <i>La sorbitol déshydrogénase</i>	41
3.1.5. OXYDATION DE LA DAB	41
3.1.6. LES ATPases	42
3.1.7. LA GLUCOSE-6-PHOSPHATASE	42
3.1.8. L'AMYLOPHOSPHORYLASE ET SON SYSTEME REGULATEUR : PHOSPHORYLASE PHOSPHATASE ET PHOSPHORYLASE KINASE	42
3.2. DISCUSSION	43
3.2.1. LE CRISTAL	43
3.2.2. LE COMPARTIMENT MATRICIEL	45
3.2.3. L'HELICE PRINCIPALE ET LE STOCKAGE DU GLYCOGENE	46
4. DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS	50
4.1. ROLE DU CHONDRIOME DANS LE SPERMATOZOIDE	50
4.2. LES REMANIEMENTS DES STRUCTURES MITOCHONDRIALES	52
4.2.1. SIGNIFICATION PHYLOGENIQUE	52
4.2.2. SIGNIFICATION FONCTIONNELLE	52
RESUME	58
BIBLIOGRAPHIE	60

INTRODUCTION

Depuis la découverte de la structure fine des mitochondries par Palade (1952) et Sjöstrand et Coll. (1953), l'unicité de structure de ces organites et sa signification fonctionnelle sont maintenant bien établies. Néanmoins, si toutes les mitochondries possèdent la même organisation fondamentale, cette organisation, étroitement dépendante de l'activité métabolique, varie dans le détail selon les tissus et leur état physiologique. Certaines variations sont mineures et portent sur le nombre et l'agencement des crêtes, la présence ou l'absence de grains denses, l'opacité de la matrice. D'autres, plus importantes, consistent en des modifications plus ou moins profondes de la structure mitochondriale. C'est le cas notamment de l'accumulation ou de la concentration de substances variées par les mitochondries. A ce sujet, Beaulaton (1964) a démontré la présence de glycogène dans certaines mitochondries de la glande prothoracique du ver à soie du chène ; ce glycogène mitochondrial a été retrouvé dans du foie de souris (Trump et coll., 1964), dans la tumeur de Warthin (Tandler et Shipkey, 1964), dans la rétine (Ishikawa et Pey, 1965), dans les cellules digestives de l'hydre (Lentz, 1966), dans des cellules nerveuses de grenouille (Berthold, 1966), dans la glande hypobranchiale des Ptéropodes (Fain-Maurel, 1966), dans la glande interrénale de la Salamandre (Picheral, 1968). Cette constatation est particulièrement intéressante car elle montre que des mitochondries spécialisées peuvent intervenir dans le métabolisme des polysaccharides. D'autres inclusions de nature variée ont également été signalées à l'intérieur des mitochondries dont elles perturbent l'architecture. Suzuki et Mostofi (1967), Yamamoto et coll. (1969) en ont dressé l'inventaire. Il s'agit pour la plupart de formations fibrillaires ou cristallines dont la signification reste difficile à préciser.

Au cours de certaines phases de l'activité cellulaire, cependant, les mitochondries peuvent subir des transformations complexes entraînant des remaniements plus ou moins importants des structures originelles. Il en est fréquemment ainsi au cours de la spermatogenèse lors de l'édification de la pièce intermédiaire du spermatozoïde (André, 1962; voir la revue d'Idelman, 1967, et le Symposium of Comparative Spermatology, Baccetti ed. , 1970). Chez les Gastéropodes Pulmonés notamment, le dérivé mitochondrial ainsi formé présente une structure aberrante dont la nature mitochondriale ne peut-être reconnue que si l'on suit son apparition et son évolution au cours de la spermatogenèse (Grassé et coll., 1956; André, 1962; Tahmisian, 1964).

Le but de notre travail est, d'essayer, chez ces Gastéropodes Pulmonés,

- 1) de suivre, au niveau des ultrastructures et par la cytochimie, le devenir des constituants mitochondriaux au cours de la spermatogenèse et dans le dérivé mitochondrial du spermatozoïde.
- 2) d'établir la signification fonctionnelle des remaniements mitochondriaux
- 3) de déterminer le rôle de ce dérivé mitochondrial d'architecture nouvelle dans le spermatozoïde.

Comme l'a montré André (1962) la pièce intermédiaire de ce spermatozoïde comporte, dans son axe, les fibres axonématiques du flagelle, entourées de la membrane externe de l'enveloppe mitochondriale ; à sa périphérie elle est limitée par deux membranes, la membrane plasmique d'une part et la membrane externe de l'enveloppe mitochondriale d'autre part. C'est entre la portion périflagellaire et la portion périphérique, de la membrane mitochondriale externe qu'est situé le dérivé mitochondrial. La majeure partie du volume mitochondrial est faite d'un matériel paracristallin de forme très complexe. Ce matériel constitue deux manchons : l'un interne, cylindrique, de position périflagellaire, l'autre, externe, sculpté de nervures hélicoïdales au nombre de 3 chez la Testacelle alternant avec un nombre égal de sillons hélicoïdaux. L'une des nervures, plus saillante, est dite principale ; les autres sont dites secondaires.

L'espace entre les deux manchons délimite des canaux hélicoïdaux qui sont nommés hélices. Dans la nervure principale est logée l'hélice principale qui contient un matériel d'apparence réticulée avec les techniques employées par André. Son angle externe est souvent occupé par un enroulement de membranes ; dans sa portion tout à fait antérieure elle renferme une structure fibreuse décrite par Grassé et coll. sous le nom de "côte". Dans la ou les nervures secondaires sont logées les hélices secondaires qui contiennent un matériel homogène parcouru de petits canaux. Certaines observations nouvelles concernant l'édification du paracristal et des canaux nous ont conduit à compléter et à discuter les interprétations des précédents auteurs.

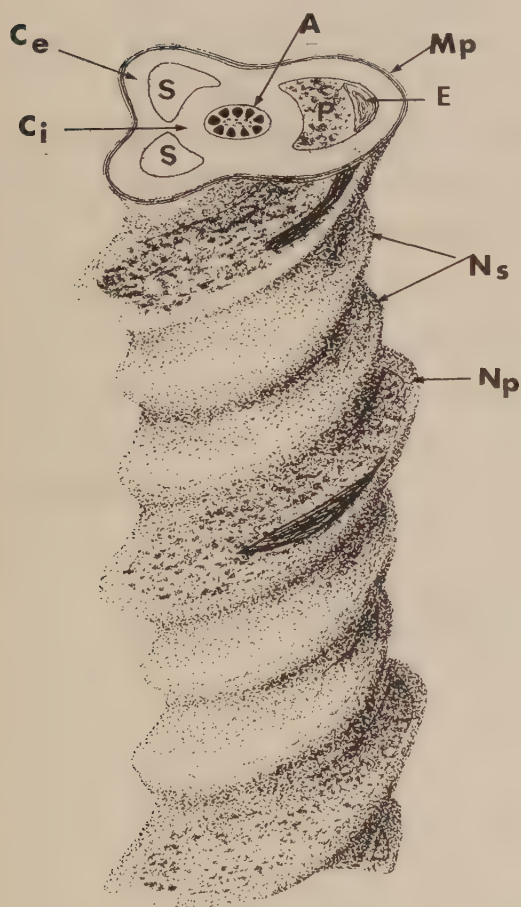


Schéma tridimensionnel de la pièce intermédiaire du spermatozoïde de la Testacelle. Les hélices (S : secondaires, P : principale) sont supposées vues par transparence au travers du cristal Ce et Ci.

*Mp : membrane plasmique
Ns : nervures secondaires
Np : nervure principale
E : enroulements membraneux de l'hélice principale
A : axonème*

Ainsi, dans le dérivé mitochondrial des Gastéropodes Pulmonés, la majeure partie des membranes, qui représentent l'élément fondamental des mitochondries banales s'est "métamorphosée" (André, 1962) en un matériel paracristallin. On sait que les membranes mitochondriales sont essentiellement constituées de phospholipides (30 à 35 %) et de protéines (60 à 70 %). "La répartition du matériel mitochondrial sous une architecture nouvelle repose le problème de l'interprétation des structures en termes cytochimiques" (André, 1962). Se basant

essentiellement sur des données morphologiques, André a conclu à la nature protéique du matériel paracristallin que nous dénommerons par la suite cristal. Il nous a semblé nécessaire, pour vérifier cette interprétation d'entreprendre l'étude cytochimique systématique de ces dérivés mitochondriaux.

Il est généralement considéré que, dans les mitochondries banales, les enzymes du cycle de Krebs et de l'hélice de Lynen se localisent dans la matrice tandis que les enzymes de la chaîne respiratoire font partie intégrante des crêtes et du feuillet interne de l'enveloppe ; selon Lehninger (1964) les enzymes respiratoires représentent 25 % des protéines membranaires. Chez les Pulmonés, la morphologie mitochondriale est toute différente : la plupart des structures mitochondriales originelles a disparu et une structure nouvelle en majeure partie occupée par un cristal s'est édifiée. André a observé que ce dérivé continue de réagir au vert Janus et présente une forte activité déshydrogénasique mise en évidence par la réduction du nitro BT en formazan en présence du substrat approprié. Par ces réactions cytochimiques observées en microscopie ordinaire, André montra que les protéines respiratoires persistent mais il ne put les localiser de façon précise sur les nouvelles structures. Il nous a paru particulièrement intéressant de compléter ces observations par une étude cyto-enzymologique ultrastructurale de façon à rechercher dans quelle mesure les bouleversements structuraux se traduisent sur le plan fonctionnel.

* * * * *

Notre travail comprend quatre chapitres. Un chapitre préliminaire concerne le matériel et les techniques employées. Deux chapitres descriptifs exposent l'un, l'aspect morphologique de l'évolution mitochondriale, l'autre, les résultats de l'étude cytochimique. Ces derniers, qui ont fait l'objet de publications, sont brièvement rappelés et discutés. Ces publications figurent en annexe ; ce sont les suivantes :

- n° 1 - Etude cytochimique du dérivé mitochondrial du spermatozoïde de la Testacelle : recherche des protéines et des lipides (*J. Microscopie*, 1965, 4, 627-642)
- n° 2 - Compartimentage des activités enzymatiques dans le spermatozoïde de certains mollusques Gastéropodes.
1. Localisation des déshydrogénases (*J. Cell Science*, 1969, 4, 693-707). Avec la collaboration de W.A. Anderson.
- n° 3 - Existence de glycogène mitochondrial dans le spermatozoïde de la Testacelle (*J. Microscopie*, 1964, 3, 643-650). Avec la collaboration de J. André.
- n° 4 - Localisation mitochondriale d'enzymes liées au métabolisme du glycogène dans le spermatozoïde de l'Escargot (*J. Cell Biol.*, 1970, 44, 20-28). Avec la collaboration de W.A. Anderson.
- n° 5 - Chemical compartmentalisation in *Helix* spermatozoa. (*J. Microscopie*, 1968, 7, 367-390). En collaboration avec W.A. Anderson et J. André.
- n° 6 - The cytochemical localization of sorbitol deshydrogenase activity in spermatozoa of *Helix aspersa*. (*J. Microscopie*, 1969, 8, 97-102). En collaboration avec W.A. Anderson.
- n° 7 - Etude comparée des évolutions mitochondriales au cours de la spermatogenèse chez quelques Gastéropodes (*Symposium on Comparative Spermatology*. Romme-Sienne, Baccetti ed. 1970). Avec la collaboration de W.A. Anderson.
- n° 8 - The cytochemical localization of glycolytic and oxidative enzymes within mitochondria of spermatozoa of some pulmonate gastropods. (*J. Histochem. Cytochem.*, 1970, 18, 783-793). En collaboration avec W. A. Anderson.

Dans le dernier chapitre, nous faisons la synthèse des particularités morphologiques et fonctionnelles de l'évolution du chondriome des cellules séminales chez les Gastéropodes Pulmonés, et nous tentons d'en dégager la signification dans le cadre du devenir du chondriome et de son rôle dans le spermatozoïde

1. MATERIEL ET TECHNIQUES

1.1. MATERIEL

Nous avons principalement utilisé les espèces *Helix aspersa* (Müll.) et *Testacella haliotidea* (Drap.). Les espèces *Helix pomatia* (L.) *Limnea stagnalis* (L.) *Planorbis corneus* (L.) *Arion aggericola* (M.) ont également été examinées.

Tous ces animaux appartiennent au groupe des Mollusques Gastéropodes Pulmonés.

1.2. TECHNIQUES

1.2.1. PREPARATION DES TISSUS POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

L'ovotestis et le canal hermaphrodite sont prélevés et placés pendant 45 à 60 minutes dans le glutaraldéhyde. La solution suivante (Anderson, Weissman et Ellis, 1967) a été utilisée : 8 ml de glutaraldéhyde à 25%, 1,5g de sucrose, 50 ml de cacodylate de sodium à 0,1M, 42 ml d'eau distillée. Après fixation les tissus sont lavés rapidement dans du cacodylate de sodium 0,1M contenant du sucrose 0,15M, puis fragmentés en petits morceaux de 1 à 3 mm³ qui sont postfixés par le tétroxyde d'osmium en solution aqueuse à 2% pendant 1 heure. Après déshydratation par l'acétone, l'inclusion est faite dans un mélange d'Araldite et d'Epon (Voelz et Dworkin, 1962 ; Anderson et Ellis, 1967). Les coupes réalisées au moyen de couteaux de verre sont contrastées par flottage sur l'acétate d'uranyle en solution aqueuse saturée ou en solution à 2% dans l'alcool 50°, puis par le citrate de plomb (Venable et Coggeshal, 1965).

1.2.2. TECHNIQUES CYTOCHIMIQUES

Il ne sera fait mention que de ce qui a trait à la cytochimie ultrastructurale, l'étude prospective entreprise par les méthodes de la cytochimie en lumière visible ayant fait l'objet d'un mémoire intitulé "*Etude cytochimique du spermatozoïde de la Testacelle*" (1965) dont on trouvera l'essentiel dans les publications n° 1 et 3 de l'annexe.

1.2.2.1. Recherche des protéines et du glycogène par les techniques d'extraction enzymatique

Au cours des dix dernières années, ces techniques ont connu un développement considérable dans la recherche de la nature chimique des organites à l'échelle ultrastructurale, principalement pour la mise en évidence des acides nucléiques, des protéines et du glycogène.

A l'époque où nous avons effectué ces expériences, l'emploi des résines hydrosolubles était encore peu usité et il était considéré que les enzymes n'agissent pas sur les tissus préparés par les techniques courantes (osmium-épon). C'est la raison pour laquelle nous avons, en dépit des ennuis inhérents à ce processus expérimental, essentiellement effectué les extractions sur des fragments de tissus à l'état frais ou après une légère fixation aldéhydique (publications n° 1 et 3 de l'annexe).

Les enzymes suivantes ont été utilisées :

Protéases : trypsine 2X cristallisée (NBC), α -chymotrypsine 3X cristallisée (NBC), pan-protéase (Worthington), papaïne 2X cristallisée (NBC), pepsine 3X cristallisée (NBC).

Amylases : α -amylase 2X cristallisée (Worthington), β -amylase de l'igname (Worthington).

Les protocoles détaillés sont décrits dans les publications n° 1 et 3 de l'annexe ; ils ne seront pas rappelés ici.

Dans le but de vérifier ces expériences déjà anciennes, nous avons, depuis fait l'extraction par la pepsine sur coupes de matériel inclus au glycol-méthacrylate selon la technique de Leduc et coll. (1963). Nous avons également appliqué la technique de Monneron et Bernhard (1966) en faisant agir l' α -amylase, la pronase et la pepsine sur coupes de tissus inclus en épon.

1.2.2.2. Extraction chimique des lipides

Idelman (1963) a le premier appliqué à l'étude des ultrastructures, les techniques, d'extraction des lipides cellulaires par différents solvants, développées par Keilig (1944). C'est son mode opératoire que nous avons employé (publication n° 1 de l'annexe).

1.2.2.3. *Mise en évidence du glycogène par la réaction acide périodique-thiosemicarbazide-protéinate d'argent.*

Cette réaction caractérise les groupements glycols des polysaccharides. Il s'agit d'une variante de la réaction APS applicable en microscopie électronique. La technique originale est due à Hanker et coll.(1964) et à Seligman et coll.(1965) qui ont montré que la thiosemicarbazide (TSC), ou la thiocarbohydrazide (TCH), se complexent avec les groupements fonctionnels aldéhyde apparus au cours de l'oxydation périodique des polysaccharides; les groupements *thio-* de la thiosemicarbazide ou de la thiocarbohydrazide sont ensuite visualisés par réduction du tétroxyde d'osmium à l'état de vapeurs. Nous avons utilisé la modification introduite par Thiéry (1967) où les groupements *thio-* sont révélés par le protéinate d'argent. Thiéry a d'autre part montré qu'il n'y a pratiquement que le glycogène qui réagisse après un temps d'action de la TSC ou de la TCH de l'ordre de 30 à 40 minutes.

1.2.3. *TECHNIQUES CYTOENZYMOLOGIQUES*

Ces techniques doivent répondre à deux impératifs.

Le premier est de conserver les ultrastructures tout en maintenant aux enzymes une activité suffisante pour permettre leur mise en évidence cytochimique, ce que ne réalise pas la fixation osmique. Le formol, utilisé couramment pour les recherches enzymologiques en microscopie ordinaire, s'est révélé un assez mauvais fixateur des ultrastructures, jusqu'à l'introduction par Robertson et coll. (1963) et Karnovsky (1965) de solutions de formaldéhyde obtenu par dépolymérisation extemporanée de paraformaldéhyde. A la suite du travail de Sabatini et coll. (1964) l'utilisation d'autres aldéhydes, principalement l'hydroxyadipaldéhyde et le glutaraldéhyde a permis la mise en évidence de plusieurs activités enzymatiques au niveau des ultrastructures.

Dans notre travail, nous avons employé de légères pré-fixations aldéhydiques: glutaraldéhyde et formaldéhyde obtenu par dépolymérisation extemporanée de paraformaldéhyde. Cependant sur notre matériel, certaines enzymes, succinodéshydrogénase et phosphorylase, n'ont pu être mises en évidence que sur des tissus non fixés. Pour cela, les spermatozoïdes représentent un matériel favorable étant donné leur grande résistance aux conditions peu physiologiques des incubations; très souvent il y a lyse des membranes périphériques des spermatozoïdes (membrane plasmique

et membrane externe de l'enveloppe mitochondriale), mais les structures mitochondriales sont bien conservées.

Le second est d'obtenir un produit de réaction non diffusible et suffisamment opaque aux électrons.

Ce second impératif était déjà réalisé dans les techniques de mise en évidence des phosphatases en microscopie ordinaire par la méthode de Gomori (1939, 1941), le phosphate libéré étant précipité sous forme d'un sel métallique insoluble ((phosphate de calcium ou de plomb) très opaque aux électrons. Les phosphatases furent ainsi les premières enzymes à être visualisées à l'échelle des ultrastructures (Sheldon et coll., 1955, 1956).

Un certain nombre d'auteurs, Barrnett (1959, 1960), Edwards et Valentine (1963), Sedar et coll. (1962) ont montré que les formazans produits par la réduction des sels de tétrazolium (NBT et TNBT) présentent une opacité suffisante pour être visibles en microscopie électronique.

Dans le but d'appliquer en microscopie électronique d'une façon plus générale les réactions de la cytochimie classique, Seligman et son équipe se sont attachés à synthétiser et à introduire de nouveaux composés qui, après réaction, donnent un produit insoluble et osmiophile. Ce dernier réagit alors avec l'osmium lors de la postfixation et il y a formation de noir d'osmium insoluble dans les solvants organiques. Cette méthode est actuellement applicable à la mise en évidence, des déshydrogénases à l'aide du TC-NBT (thiocarbamyl nitro bleu de tétrazolium) (Seligman et coll., 1967), de différentes métalloprotéines à l'aide de la DAB (diaminobenzidine) : peroxydases (Graham et Karnovsky, 1966; Novikoff et Goldfischer, 1968), cytochrome oxydase (Seligman et coll., 1968, Roels, 1970), cytochrome c (Beard et Novikoff, 1969, Karnovsky et Rice, 1969; Roels, 1970).

Dans notre travail nous avons recherché les enzymes suivantes, désignées selon la *nomenclature des enzymes* adoptée par l'*INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY* en 1961 (Florkin et Stotz, 1964) à laquelle se rapportent les numéros italiques placés entre parenthèse.

1.2.3.1. Les ATPases

* ATP phosphohydrolase activée par l'ion Ca^{++} (3.6.1.3.) selon les techniques de Padykula et Herman (1955), et Nelson (1958) (voir publication n° 5 de l'annexe).

* ATP phosphohydrolase activée par l'ion Mg^{++} (3.6.1.4.) selon les techniques de Wachstein et Meisel (1957) et Padykula et Gauthier (1963) (voir publication n° 5 de l'annexe).

Ces enzymes ont été recherchées sur des spermatozoïdes immobiles prélevés directement dans le canal hermaphrodite et sur des spermatozoïdes dont on a induit la motilité par incubation dans un milieu contenant 5 à 10 mg/ml de trypsine (André, communication personnelle).

1.2.3.2. La D-Glucose-6-phosphate phosphohydrolase (3.1.3.9.) (glucose-6-phosphatase) en utilisant le milieu de Chiquoine (1953) (voir publication n° 5 de l'annexe).

1.2.3.3. Les déshydrogénases

* Succinate : oxydoréductase (1.3.99.1.) (succinate déshydrogénase)

* L-glycérol-3-phosphate : cytochrome c oxydoréductase (1.1.2.1.) (glycérophosphate déshydrogénase mitochondriale).

* NADH_2 : cytochrome c oxydoréductase (1.6.2.1.) (NADH_2 diaphorase)

* L-isocitrate : NAD oxydoréductase (1.1.1.41.) (Isocitrate déshydrogénase)

* L-Malate : NAD oxydoréductase (1.1.1.37.) (malate déshydrogénase)

* D-3-hydroxybutyrate : NAD oxydoréductase (1.1.1.30.) (hydroxybutyrate déshydrogénase).

* L-lactate : NAD oxydoréductase (1.1.1.27.) (lactate déshydrogénase)

* D-glycéraldéhyde-3-phosphate : NAD oxydoréductase (1.2.1.12.) (glycéraldéhydephosphate déshydrogénase)

* Sorbitol déshydrogénase

Pour la recherche des déshydrogénases nous avons employé les sels de tétrazolium NBT, (nitro bleu de tétrazolium) TNBT (tétra nitro bleu de tétrazolium), TC-NBT (thiocarbamyl nitro bleu de tétrazolium), (voir les publications n° 2 et 6 de l'annexe).

Pour les déshydrogénases NAD dépendantes, l'utilisation du phénazinéméthosulfate (PMS) qui agit comme transporteur intermédiaire d'électrons, permet de séparer la déshydrogénase spécifique de la diaphorase liée (tétrazolium réductase liée au NAD) (Farber et coll., 1956 ; Fahimi et Amarasingham, 1964 ; Fahimi et Karnovsky, 1966).

Nous avons observé que la diffusion du formazan au cours de la déshydratation et dans les milieux d'inclusion est très diminuée lorsque l'on pratique une postfixation aldéhydique après l'incubation.

1.2.3.4. *La cytochrome c : oxygène oxydoréductase (1.9.3.1.)*
(*cytochrome c oxydase*)

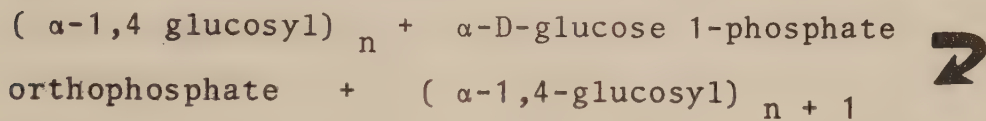
Après incubation de nos tissus dans les milieux de Moog (1943) et de Burstone (1959) utilisés en microscopie ordinaire, l'examen au microscope électronique montre des résultats inconstants. De plus, après incubation dans le milieu de Burstone, le produit de réaction se présente, comme celui observé par Seligman et coll. (1967) avec la N-benzyl-p-phénylène diamine, en gros amas qui rendent impossible la localisation ultrastructurale précise. Nous avons pu vérifier l'hypothèse de Seligman et coll. (1967) concernant l'osmiophilie du pigment formé lors de l'incubation dans le mélange "nadi".

Ce dernier ne présente en effet une opacité suffisante à sa mise en évidence, telle celle observée par Sabatini et coll. (1963, 1964), qu'après fixation osmique ; il n'est pas décelable après une simple fixation aux aldéhydes.

La 3,3' diaminobenzidine (DAB) introduite par Graham et Karnovsky (1966) pour la mise en évidence des peroxydases et utilisée par Seligman et coll. (1968) pour la cytochrome oxydase présente l'avantage de donner un produit d'oxydation extrêmement fin. Les résultats que nous présentons ont été obtenus en utilisant la DAB selon les procédés de Seligman et coll. (1968) Novikoff et Goldfischer (1969), et Beard et Novikoff (1969).

1.2.3.5. L' α -1,4-glucan : orthophosphate glucosyltransférase (2.4.1.1.) (amylophosphorylase) et son système régulateur, ATP : phosphorylase phosphotransférase (2.7.1.38.) (phosphorylase kinase) et phosphorylase phosphohydrolase (3.1.3.17) (phosphorylase phosphatase) contrôlant l'équilibre entre la forme active (a) et la forme inactive (b).

In vivo, l'amylophosphorylase est considérée comme catalysant la première étape de la glycogénolyse en phosphorylant en glucose 1-phosphate les unités glucosyl arrachées au glycogène. Dans les conditions cytochimiques, l'excès de glucose 1-phosphate déplace l'équilibre vers la synthèse :



On peut mettre en évidence l'action de l'enzyme en précipitant le phosphate par un sel de plomb comme pour les autres phosphatases. Cette méthode appliquée par Hori (1964) ne nous a donné aucun résultat positif, probablement à cause d'une inactivation de l'enzyme par les sels de plomb (voir publication n° 4 de l'annexe). On peut aussi visualiser l'allongement des chaînes amylosiques. C'est le principe de la méthode de Takeuchi et Kuriaki (1955) en microscopie ordinaire : après incubation des tissus dans un substrat approprié, le polysaccharide néoformé est mis en évidence par sa coloration à l'iode ; la coloration varie du rouge au bleu selon la longueur de la chaîne glycogénique (Swanson, 1948). C'est ce procédé que nous avons appliqué pour déceler l'activité amylophosphorylasique en microscopie électronique. Nous avons constaté que les techniques spécifiques de mise en évidence des polysaccharides introduites par Seligman et coll. (1965) et modifiées par Thiéry (1967), permettent de visualiser un accroissement des plages de glycogène après incubation dans les milieux appropriés de Takeuchi et Kuriaki (1955), Takeuchi (1958), Guha et Wegmann (1959) (voir publication n° 4 de l'annexe). Par un procédé similaire, Wanson et Drochmans (1967) ont pu, utilisant la coloration négative, montrer le glycogène néoformé par l'amylophosphorylase au niveau de la particule de glycogène isolée.

2. ASPECT MORPHOLOGIQUE DE L'EVOLUTION MITOCHONDRIALE

2.1. HISTORIQUE

Les travaux d'Ancel (1903) et de Gatenby (1917, 1918) constituent les connaissances de base sur l'histogénèse de la glande hermaphrodite et des différentes étapes de la spermatogénèse des Gastéropodes Pulmonés. Beams et Tahmisian (1954) signalèrent la disposition concentrique des structures mitochondriales de la spermatide d'Escargot et André (1956) montre que, dans les spermatocytes, les crêtes sont longitudinales. Grassé et coll. (1956) confirmèrent ces observations et montrèrent qu'il s'agissait de stades évolutifs au cours desquels les crêtes longitudinales prennent progressivement une disposition concentrique. Puis, une partie des mitochondries modifiées est polarisée par le flagelle ; elles se groupent autour de lui et fusionnent entre elles. Des lacunes séparent ensuite le dérivé mitochondrial ainsi formé en deux ensembles : une gaine périphérique et une gaine périflagellaire. Des "soudures" réunissent les deux gaines partageant la lacune en deux. L'une, plus volumineuse, renferme par la suite une baguette fibreuse, "la côte". Les structures subissent alors des remaniements macromoléculaires au cours desquels la gaine mitochondriale acquiert une architecture nouvelle.

André (1959, 1962) montra que la gaine est en majeure partie constituée par un matériel tridimensionnellement périodique à maille parallélépipédique dont les noeuds sont des bâtonnets creux d'un diamètre de 90 Å à 100 Å ; les plans réticulaires étant des surfaces courbes, André qualifia la structure de paracristalline. Il montra que les dispositions concentriques et radiaires décrites par Grassé et coll. correspondent en fait à des coupes d'incidences différentes du réseau cristallin.

La cristallisation résulte, selon son expression d'une véritable *métamorphose mitochondriale*. L'évolution mitochondriale débute dès le stade spermatocyte par la dilatation des crêtes, dont le contenu fut dénommé *pseudomatrice* par cet auteur. On observe alors une "sorte d'inversion des contrastes par rapport aux mitochondries banales" (André, 1962) : les feuillettes denses décrits par Grassé et coll. sont en réalité des lames de matrice.

La pseudomatrice renferme de fins filaments très grêles de 70 à 80 Å de diamètre qui disparaissent dans les stades ultérieurs. Durant la spermiogénèse les structures de la gaine mitochondriale se désorganisent et il y a passage par un stade diffus. Ce dernier est fugace et très vite l'architecture nouvelle en majeure partie paracristalline s'organise. Le reste du matériel mitochondrial constitue les hélices (qui correspondent aux "lacunes" de Grassé et coll.) : l'une, plus volumineuse, dénommée hélice principale, renferme un matériel réticulé et son angle externe est souvent occupé par des enroulements membraneux, les autres, dénommées hélices secondaires, contiennent un matériel d'opacité moyenne.

Dans le travail qui va suivre, nous montrons chez *Helix aspersa*, *Helix pomatia* et *Limnea stagnalis*, que d'une part le cristal se forme, comme l'avait suggéré Tahmisian (1964), dans la pseudomatrice, en relation avec les éléments figurés qu'y a observés André. Les structures mitochondriales classiques, d'autre part, persistent au moins en partie : le contenu des hélices secondaires dérive de la matrice et la membrane qui les limite est ce qui reste de la membrane interne de l'enveloppe mitochondriale. L'hélice principale correspond à une inclusion de cytoplasme dans laquelle s'élabore un stock de glycogène lors de la maturation des spermatozoïdes.

2.2. LES ETAPES DE L'EVOLUTION CHEZ HELIX ASPERSA

2.2.1. LE SPERMATOCYTE

Dans le spermatocyte (fig.2), la population mitochondriale est essentiellement constituée de mitochondries ovoïdes à crêtes longitudinales semblables à celles des spermatogonies (fig. 1). La matrice est cependant plus opaque que celle des mitochondries spermatogoniales et renferme assez souvent des grains denses. Dans certaines mitochondries, les crêtes sont dilatées et leur contenu, dénommé pseudomatrice par André (1962), renferme des fibrilles de 70 à 90 Å de diamètre que nous décrirons plus en détail à propos de la spermatide. On observe également la présence de quelques mitochondries allongées. Le cytoplasme est très riche en ribosomes.

2.2.2. LA SPERMATIDE (fig. a et b)

Nous diviserons son évolution en 3 stades

2.2.2.1. Stade 1 : (fig. a)

Les mitochondries à crêtes dilatées par le développement de la pseudomatrice deviennent plus nombreuses (fig.3 et 4). Dans ces mitochondries, le nombre des crêtes est généralement réduit ; il peut n'en subsister qu'une seule, centrale, très dilatée, qui communique par quelques pédoncules avec l'espace intermembranaire de l'enveloppe (fig. 4,5,6,7,8). La matrice se trouve alors réduite à un manchon périphérique comprimé entre la crête dilatée et l'enveloppe mitochondriale. On note un allongement des mitochondries ainsi modifiées (fig.4). Au fur et à mesure de la dilatation des crêtes, les fibrilles de la pseudomatrice deviennent de plus en plus nombreuses ; elles sont flexueuses et disposées selon le grand axe de la mitochondrie ; leur opacité est très faible, même après double coloration (fig. 3,5,6,7,8). A un grossissement suffisant, on observe qu'elles ont un centre clair (fig. 5 et 6).

Dans d'autres mitochondries demeurées globuleuses, on observe assez souvent un accroissement de la matrice en un point de la mitochondrie, ce qui provoque une courbure des crêtes qui prennent une disposition en dôme autour d'un noyau matriciel de texture grenue. Les gros grains denses de la matrice sont souvent nombreux et groupés en amas (fig.4). Selon l'incidence des coupes, ces mitochondries présentent une morphologie extrêmement variée ; sur les coupes transversales on retrouve la disposition concentrique des crêtes et des feuilletts matriciels décrite par les précédents auteurs (Beams et Tahmisian, 1954 ; Grassé et coll., 1966 ; André, 1962) (fig. 11 et 14).

2.2.2.2. Stade 2 : (fig.b)

Nous y groupons l'ensemble des stades 2 et 3 d'André.

Dans les spermatides plus âgées, les mitochondries allongées, à matrice périphérique et à pseudomatrice centrale, entourent le flagelle puis fusionnent entre-elles (fig.4,9,10,11). A ce stade, les fibrilles sont très rarement discernables dans la pseudomatrice qui contient alors un matériel, d'opacité moyenne, à texture grenue hétérogène (fig.10 et 11). Au cours de la fusion, les membranes homologues se raccordent tandis que les compartiments

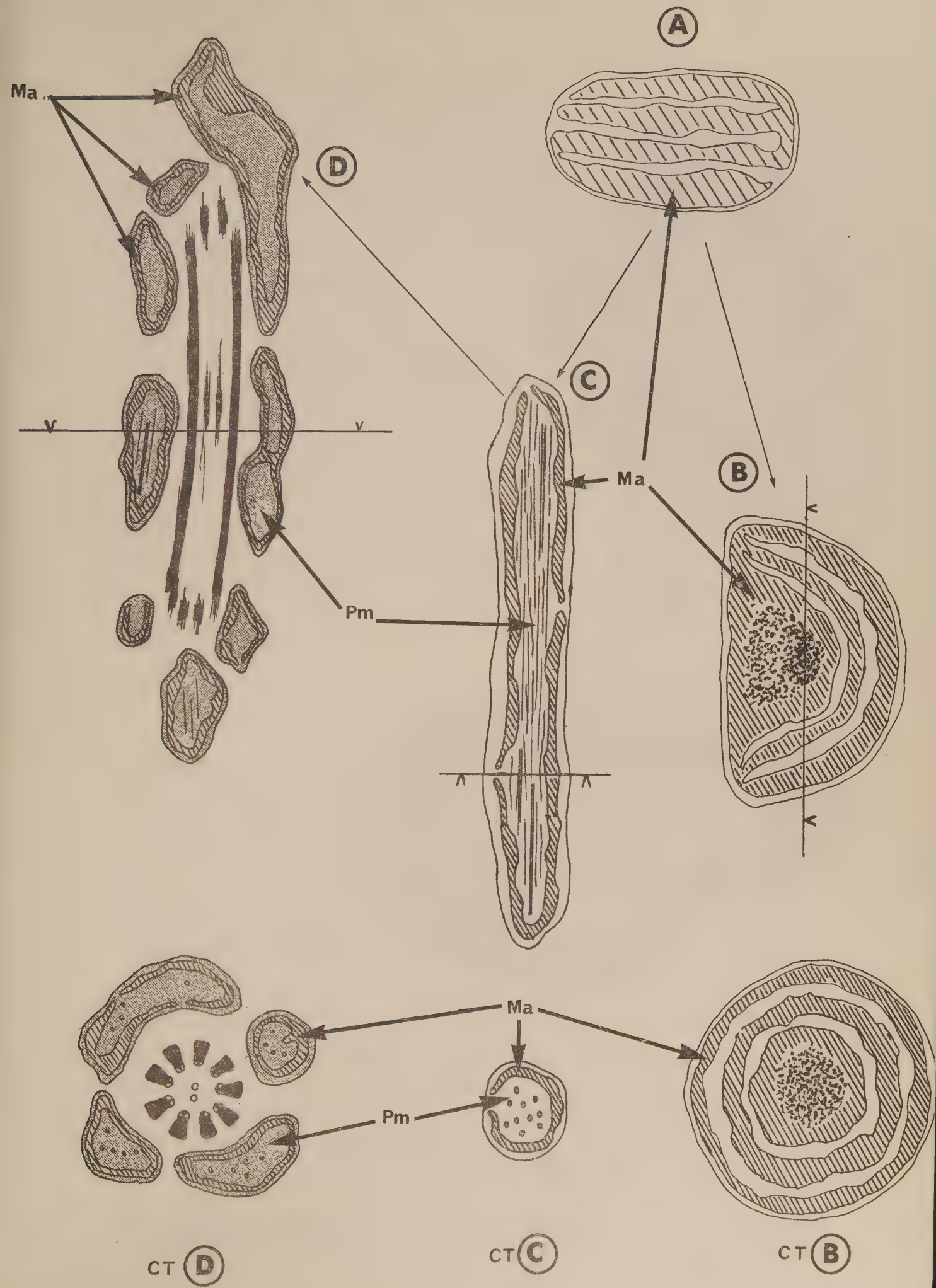
Figure a. Schémas résumant les premiers stades de l'évolution mitochondriale chez l'Escargot. (A) mitochondrie goniale, (B) et (C) mitochondries de la jeune spermatide, (B) mitochondrie globuleuse, (C) mitochondrie allongée à crête centrale dilatée par la pseudomatrice fibrillaire (Pm) coupées longitudinalement, CT (B) et CT (C) coupées transversalement. (D) groupement des mitochondries allongées autour du flagelle dans une spermatide plus agée (Cf. figure 9). CT (D) coupe transversale au même stade.



matrice (Ma)



pseudomatrice (Pm)



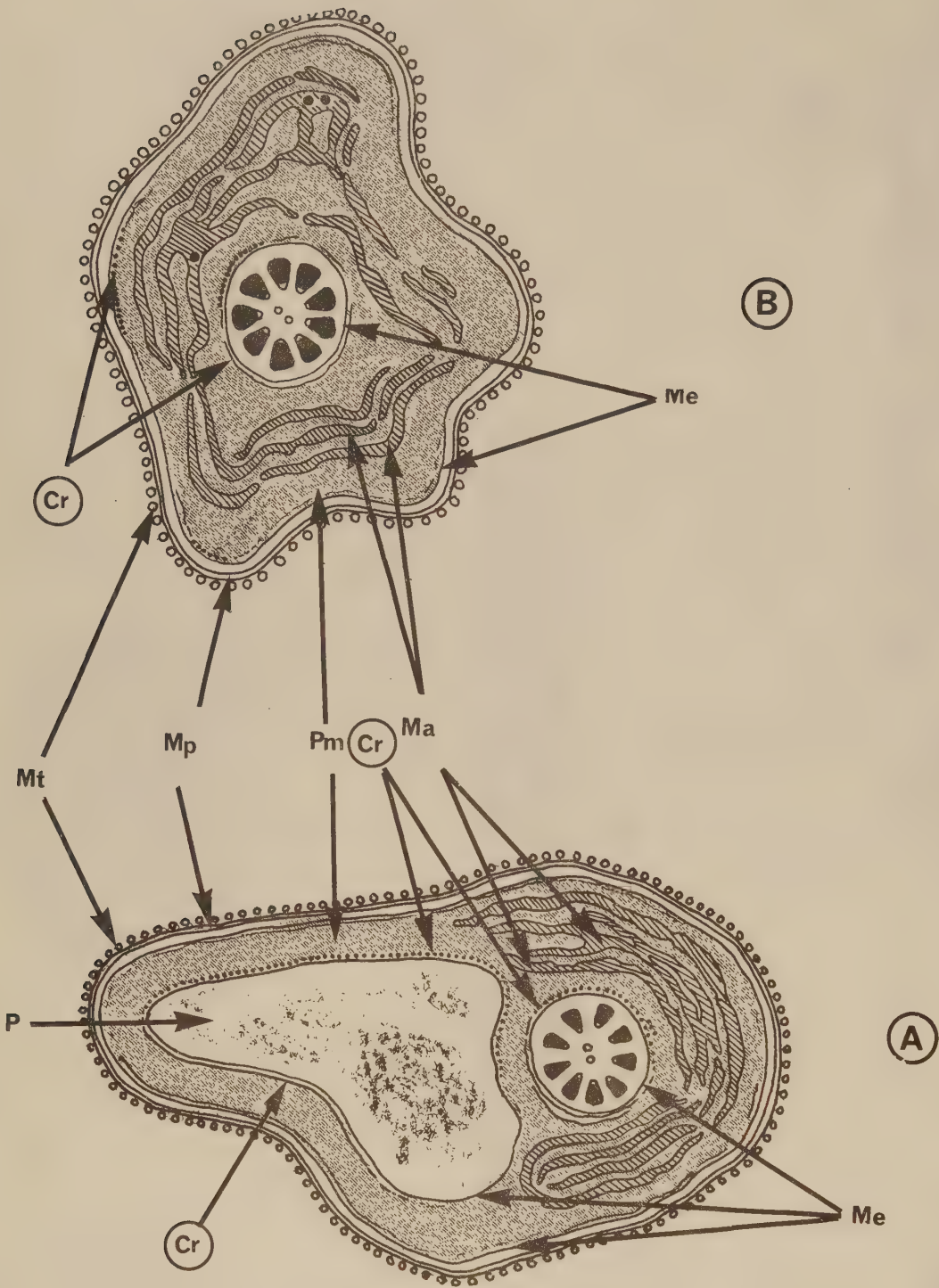


Figure b. Schéma établi à partir de la figure 17, représentant des coupes transversales de la pièce intermédiaire après la fusion des mitochondries en un seul dérivé. Dans la pseudomatrice (Pm) un matériel ordonné (Cr) s'organise le long de la membrane mitochondriale externe (Me) (hatched) Matrice (Ma). Membrane plasmique (Mp)

(A) Coupe transversale dans la région antérieure ; (B) coupe transversale dans la région médiane de la pièce intermédiaire.

de même nature, matrice d'une part et pseudomatrice d'autre part, confluent pour ne plus constituer qu'une seule entité mitochondriale qui entoure le flagelle. Cette entité ébauche la partie mitochondriale de la pièce intermédiaire du futur spermatozoïde. Sa membrane périflagellaire et sa membrane périphérique sont constituées par l'ancienne membrane mitochondriale externe. L'essentiel du volume est occupé par la pseudomatrice qui s'est opacifiée. La matrice se concentre et occupe un volume réduit constitué par les quelques manchons cylindriques très aplatis que délimite ce qui subsiste de la membrane mitochondriale interne (fig. 11 et 17). Dans la région antérieure il existe un compartiment supplémentaire : la *lacune para-axiale* (Grassé et coll. 1956) ou *hélice principale* (André, 1962) (fig. 17 et 18) dont nous envisagerons l'origine à propos du spermatozoïde. Son contenu, faiblement opaque dans son ensemble, est hétérogène ; il renferme un matériel floconneux dense qui tend à se rassembler dans la portion la plus proche du flagelle (fig. 17,18,19) pour former une baguette fibreuse la "*côte*" de Grassé et coll.

2.2.2.3. Stade 3 (fig. b)

2.2.2.3.1. *Le dérivé mitochondrial de la pièce intermédiaire.*

Des granules de 90 Å de diamètre apparaissent dans la pseudomatrice le long de la membrane mitochondriale externe : à la périphérie du dérivé mitochondrial, autour du flagelle et de l'hélice principale (fig. 17). Sur ces coupes, les granules ne sont pas visibles sur tout le pourtour de la membrane mitochondriale externe ; on les distingue seulement dans certains secteurs, tandis que dans d'autres la membrane mitochondriale externe apparaît doublée d'un feuillet dense (fig.17).

Le processus se poursuivant, de nouvelles strates de matériel granulaire s'ordonnent (fig. 18) et finissent par remplir tout le volume pseudomatriciel (fig. 19) pour constituer un cristal dont André (1959, 1962) a déterminé la structure. Il a montré que les plans réticulaires sont des surfaces courbes dans lesquelles les noeuds du réseau, disposés selon une maille parallélipipédique de 170 Å x 130 Å x 110 Å, sont occupés par les granules de 90 Å.

L'aspect du matériel cristallin diffère évidemment selon l'orientation du plan de coupe ; inversement sur des coupes semblablement orientées, on retrouve des images semblables.

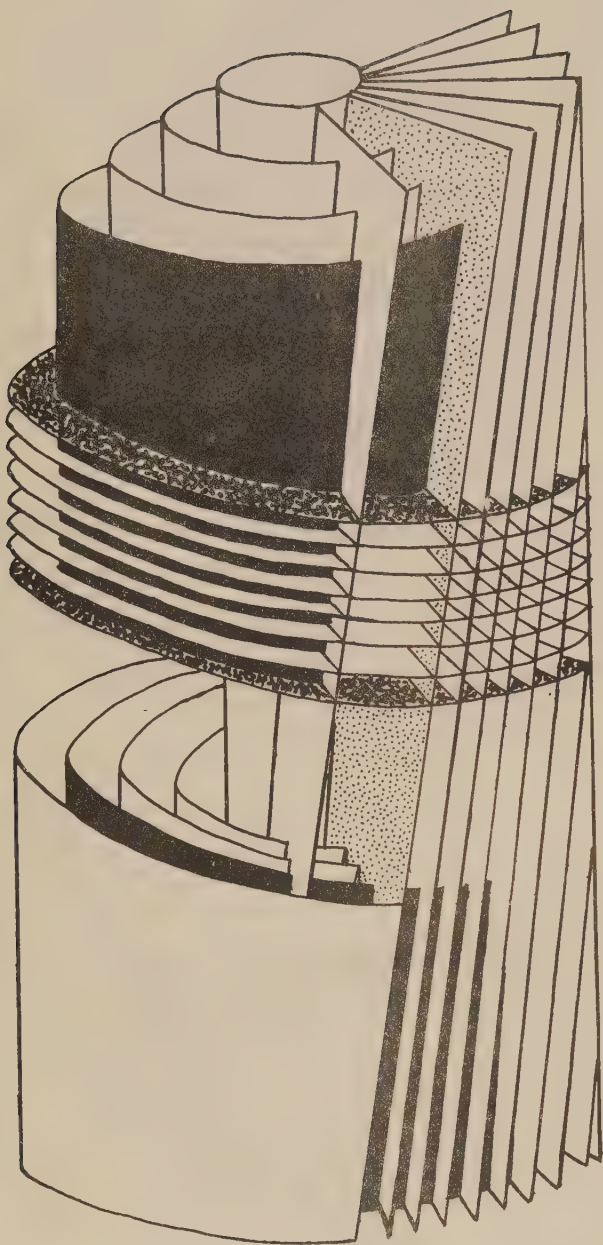


Figure c. Représentation spatiale de l'agencement des plans réticulaires du réseau cristallin. Les surfaces cylindriques sont dites plans A ●. Les surfaces hélicoïdales dont le pas est très long représentent les plans B ●; celles qui leur sont sub-orthogonales correspondent aux plans C ●.

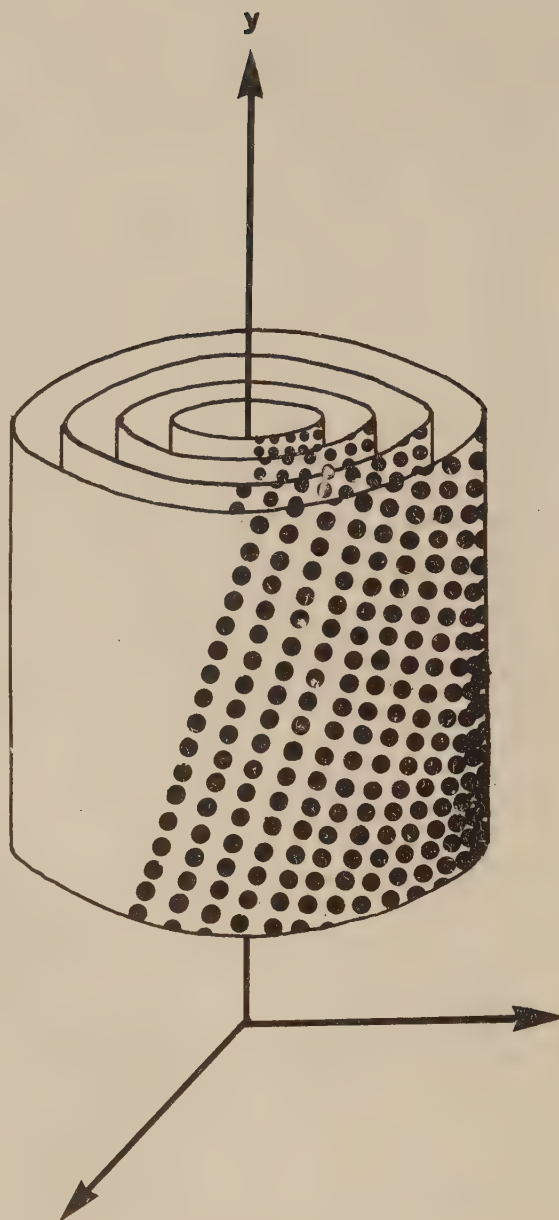


Figure d. Schéma d'ensemble d'une portion du manchon cristallin. Les points ● visualisent les noeuds du réseau. L'axe Oy est l'axe flagellaire.

Sur les coupes longitudinales (fig. 62), le matériel cristallin figure essentiellement des lignes denses, parallèles à l'axe du spermatozoïde, distantes de 170 Å ; dans certains secteurs, les lignes denses sont légèrement inclinées par rapport à l'axe, et distantes de 130 Å seulement. Sur la plupart des coupes transversales (fig. 18,19), on distingue 4 secteurs de matériel ordonné dont l'un est occupé par des rangées concentriques de granules, celui qui lui est diamétralement opposé est occupé par des lignes continues concentriques, tandis que les deux secteurs latéraux montrent des lignes obliques vers l'axe flagellaire. Dans les coupes parfaitement perpendiculaires à l'axe flagellaire, le matériel cristallin apparaît uniquement sous l'aspect de lignes denses concentriques.

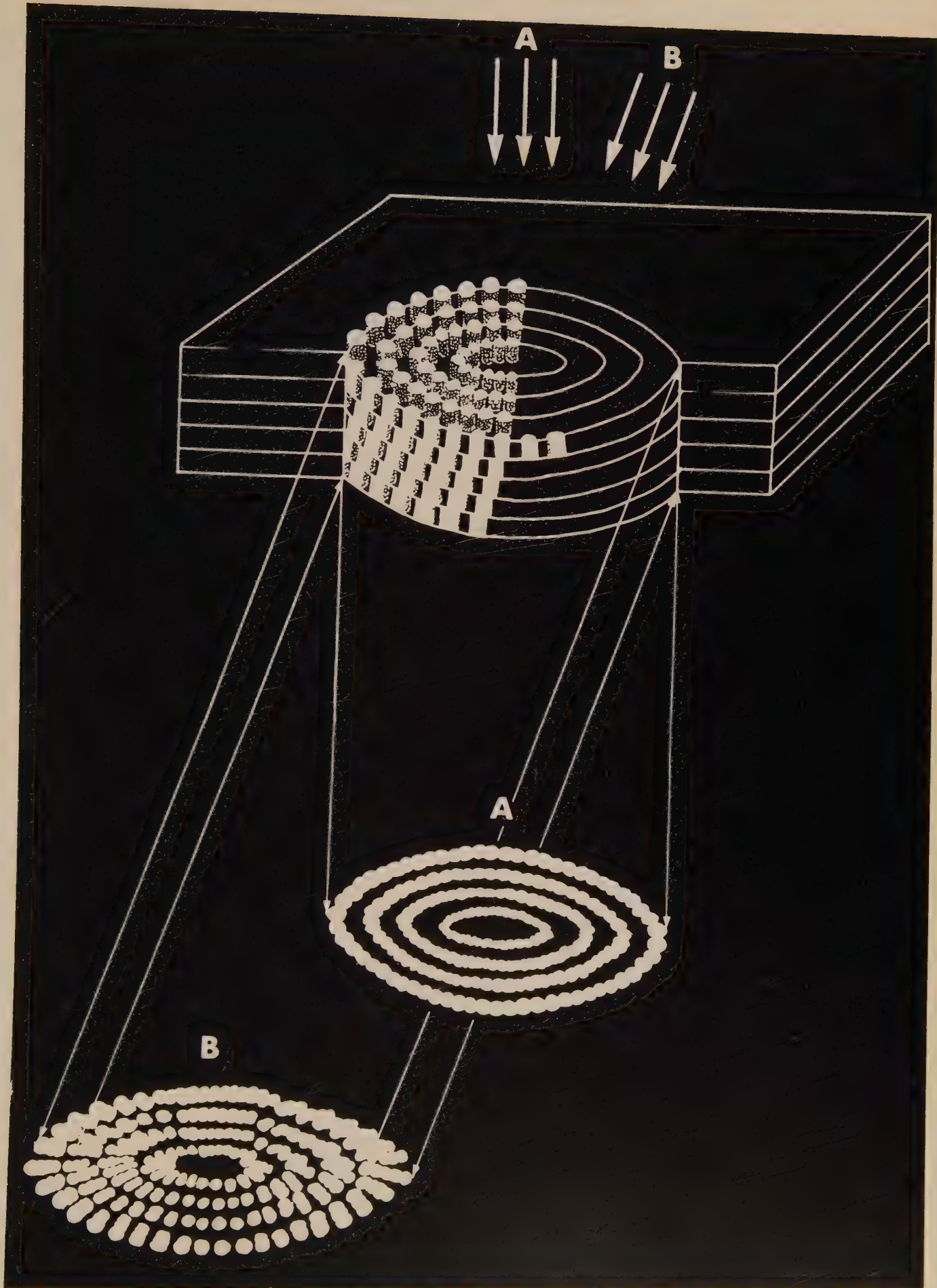
Ces différences d'aspect permettent de reconnaître et de définir les plans réticulaires (fig. c, d). Les plans de plus grande densité réticulaire ou plans A sont des surfaces cylindriques distantes de 170 Å comme l'a montré André. Les plans B et C sont des surfaces hélicoïdales sub-orthogonales entr'elles et aux plans A. Les surfaces hélicoïdales des plans B sont distantes de 130 Å et leur pas est très long. Les surfaces hélicoïdales des plans B sont distantes de 130 Å et leur pas est très long. Les surfaces hélicoïdales des plans C sont distantes de 110 Å.

Cette disposition tridimensionnelle fait que sur les coupes longitudinales (fig. 62), les lignes denses parallèles à l'axe de l'organite sont les traces des plans A sur le plan de coupe et que les lignes obliques sont les traces des plans B dans les régions où le plan de coupe est parallèle aux plans A. Pour faciliter l'interprétation des coupes transversales, nous avons réalisé un modèle en plexiglas (fig. e). Les projections de ce modèle (fig. f, g, h) montrent que les rangées de granules et les lignes concentriques sont les traces des plans principaux A, dans les secteurs où le faisceau leur est tangent, selon que les plans B lui sont parallèles ou obliques. Dans les secteurs où le plan de coupe est perpendiculaire aux plans B, leurs traces sur les différents plans A se projettent comme un point sur un plan C et on observe des rangées de granules qui dessinent un quadrillage. Dans le secteur diamétralement opposé, par contre, les plans B sont coupés obliquement ; les projections des traces des plans B sur un même plan A se recouvrent et forment des lignes concentriques

Figure e. Schéma représentant le modèle en plexiglas que nous avons réalisé d'une section du manchon cristallin. Il s'agit d'un empilement de plaques de plexiglas dans lesquelles les globules constitutifs du cristal sont matérialisés par les perforations que nous avons faites le long de cercles concentriques qui représentent les traces des plans réticulaires A sur les plaques. La superposition des plaques matérialise des cylindres concentriques qui sont les plans réticulaires A. Dans ces plans A, les globules ne sont pas alignés selon des génératrices, mais selon des hélices qui sont les traces des plans B sur les plans A.

Lorsque ce modèle est traversé par un faisceau de lumière parallèle à son axe **A** (ce qui reproduit le cas d'une coupe parfaitement perpendiculaire au flagelle). L'image projetée est une série de cercles noduleux concentriques. Ces cercles sont formés par la superposition des projections des traces des plans B sur un même plan A (Figure g).

Si le faisceau lumineux est incliné par rapport à l'axe du modèle **B** (ce qui reproduit le cas d'une coupe non parfaitement perpendiculaire au flagelle), l'image projetée montre 4 secteurs différents : l'un constitué de rangées concentriques de grains dessinant un quadrillage, celui qui lui est diamétralement opposé qui dessine des lignes noduleuses concentriques, et les secteurs latéraux qui font des lignes noduleuses obliques. La limite des secteurs est imprécise ; il y a entre les 4 secteurs des zones de transition dans lesquelles on observe le passage progressif d'un secteur au secteur adjacent. Les lignes noduleuses concentriques et les rangées concentriques de grains sont les projections des traces des plans B sur un même plan A, dans les zones où le faisceau incident est tangent aux plans A. Les lignes obliques sont formées par l'alignement des projections des traces des plans B sur des plans A consécutifs, dans les zones où les plans A sont obliques sur le faisceau (Figure h).



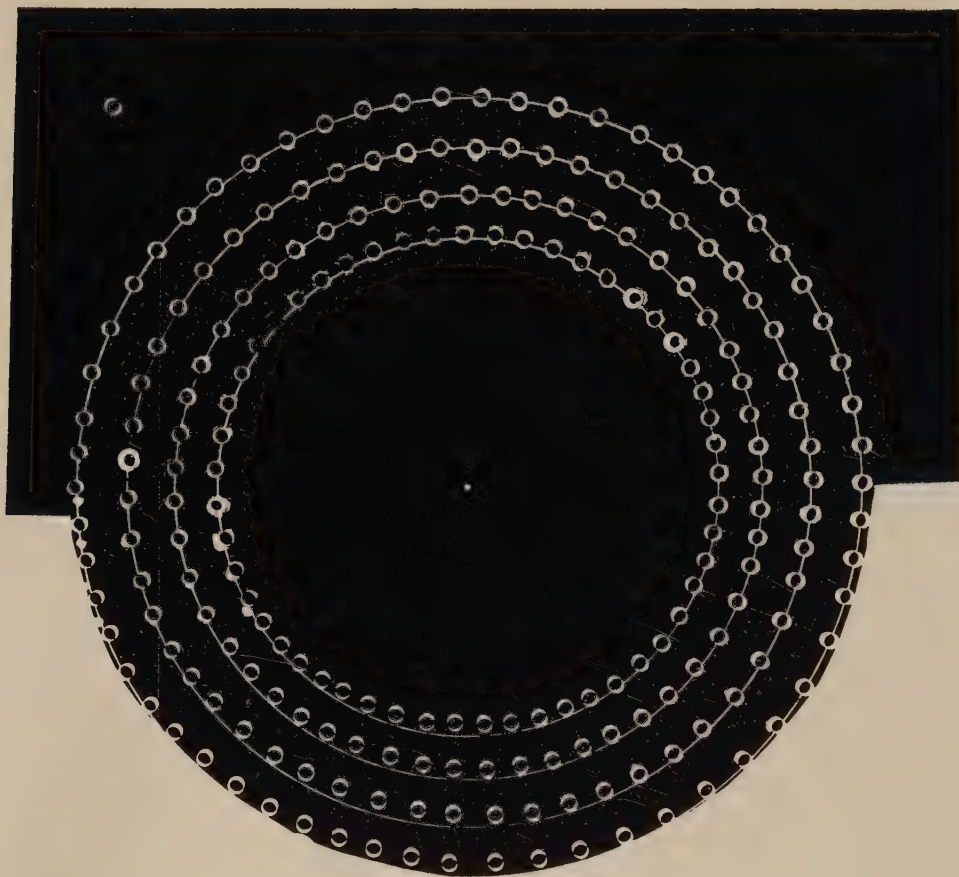


Figure f PROJECTION **A** *d'une seule plaque*

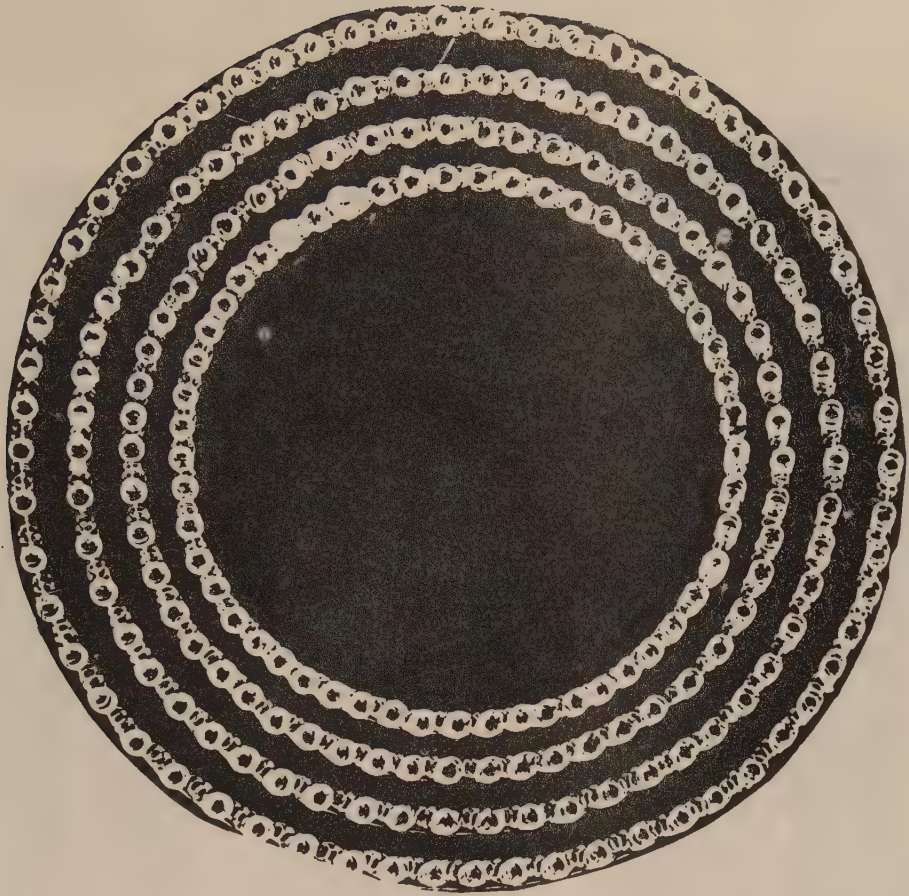


Figure g . PROJECTION **A**

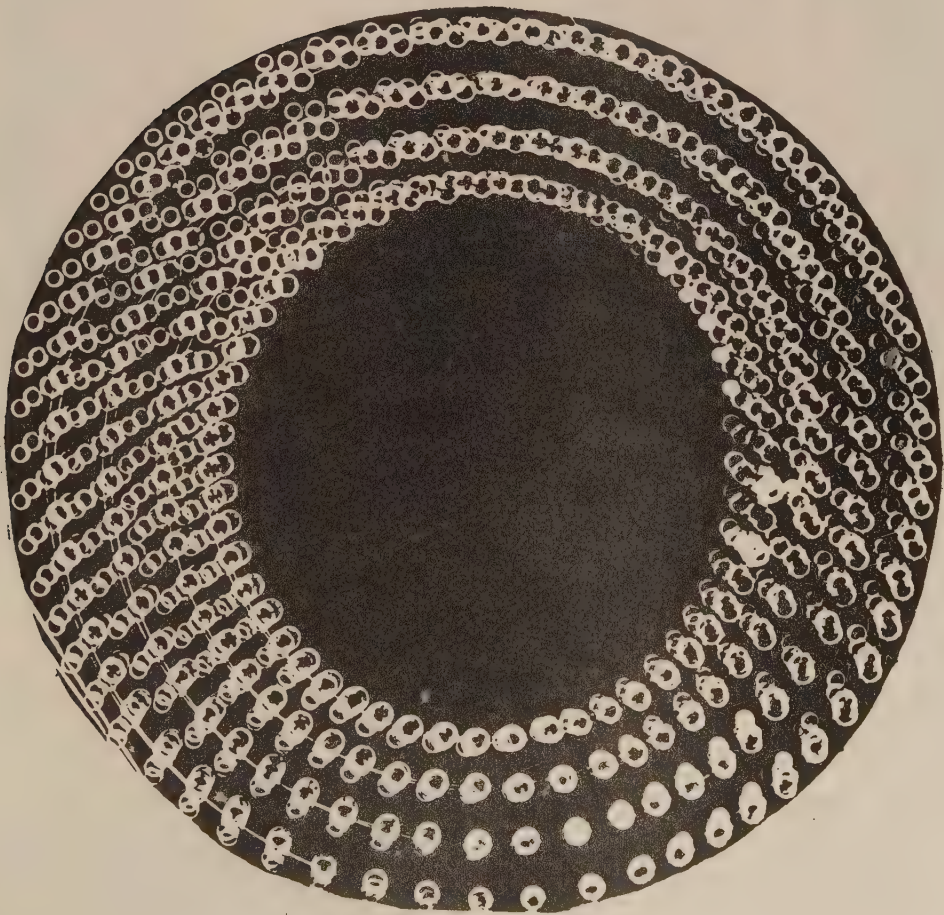


Figure h . PROJECTION **B**

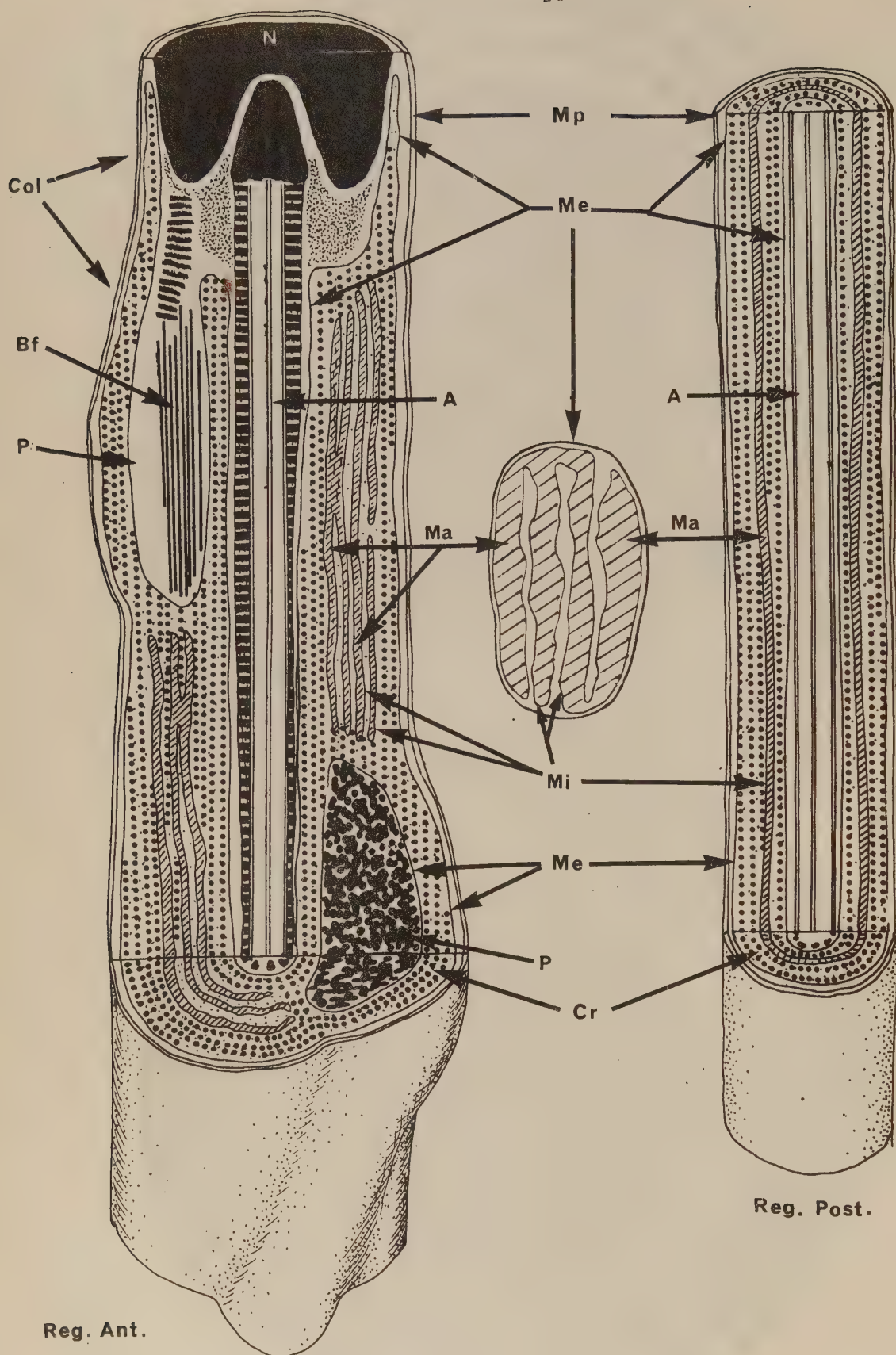


Figure i. Diagramme de la pièce intermédiaire du spermatozoïde d'Escargot. A : axonème, Bf : Baguette fibrillaire = "côte", Cr : cristal, Ma : matrice, Me : membrane externe, Mi : membrane interne, Mp : membrane plasmique, N : noyau, P : hélice principale.

Dans les secteurs où les plans A ne sont pas tangents au faisceau, les projections des traces des plans B sur les plans A adjacents peuvent s'aligner; on observe alors des lignes obliques par rapport à l'axe de l'organite.

Etant donné que les plans réticulaires sont des surfaces courbes, la limite des différents secteurs est imprécise; il y a entre les quatre secteurs des zones de transition dans lesquelles on observe le passage progressif d'un secteur au secteur adjacent.

2.2.2.3.2. *Les mitochondries du cytoplasme résiduel.*

Comme l'a montré Gatenby (1917,1918), seule une partie de la population mitochondriale, participe à l'édification de la pièce intermédiaire. Les autres mitochondries tendent à fusionner pour constituer des masses mitochondriales plus ou moins volumineuses. Dans celles-ci, les lames pseudomatricielles et matricielles ont généralement une disposition concentrique (fig. 14). Il arrive fréquemment que ces mitochondries s'appliquent contre des vésicules du réticulum endoplasmique qu'elles entourent plus ou moins complètement, mais dont elles demeurent séparées par une mince couche dense (fig. 15 et 16).

2.2.3. LE SPERMATOZOÏDE

2.2.3.1. *Le dérivé mitochondrial de la pièce intermédiaire (fig.i)*

Tout au long de la maturation du spermatozoïde se poursuit le phénomène général de condensation des constituants cellulaires essentiels qui persisteront dans le gamète mûr. Le noyau devient uniformément opaque après fixation osmique et il est impossible d'en déceler la structure par les techniques banales.

La matrice mitochondriale devient de plus en plus opaque. Dans la région antérieure du dérivé mitochondrial, le volume matriciel demeure important ; la matrice y occupe de un à cinq demi-manchons disposés concentriquement autour du flagelle. Dans la région postérieure, la matrice ne forme plus qu'un seul manchon. Les espaces séparant les manchons de matrice sont très étroits et paraissent dépourvus de tout élément figuré.

L'organisation du cristal s'achève; on y observe des dislocations et des joints de grains (André, 1962). Il remplit tout l'espace pseudomatriciel.

Le noyau et la région antérieure de la pièce intermédiaire, ceinturés de microtubules, ont leur surfaces sculptées de nervures et de sillons hélicoïdaux. La région postérieure de la pièce intermédiaire, dépourvue de microtubules, ne présente pas de telles sculptures.

Dans la région du col, le dérivé mitochondrial délimite, à la base du noyau, un entonnoir qui se prolonge par un long canal hélicoïdal paraflagellaire, à l'intérieur de la pièce intermédiaire (fig. 60, 61, 63). Ce canal dénommé *hélice principale* par André a un volume plus faible que dans la spermatide. L'édification de la baguette fibreuse commencée dans la spermatide s'est achevée; cette baguette, très compacte, est en continuité avec les structures du col (fig. 60 et 61) (Anderson et Personne, 1967). Nous avons observé à l'intérieur de l'hélice principale la présence de vésicules, remplies d'une substance réticulée, morphologiquement semblables aux vésicules ergastoplasmiques du cytoplasme environnant (fig. 21). En quelques rares occasions nous avons également trouvé des microtubules dans cette hélice principale (fig. 22).

En fin de maturation des spermatozoïdes, des granules d'un diamètre de 250 Å, groupés en rosettes, fortement contrastés par le plomb, apparaissent au sein de l'hélice principale (fig. 23); dans les spermatozoïdes matures les granules occupent la majeure partie de l'hélice et les groupements en hélice ne sont plus visibles.

2.2.3.2. Le cytoplasme résiduel

Parallèlement à l'achèvement des organites caractéristiques du spermatozoïde, le cytoplasme résiduel est éliminé. Les mitochondries qu'il renferme sont parfois gigantesques; leur pseudomatrice s'est également cristallisée et on y retrouve des

plans réticulaires courbes comme dans la pièce intermédiaire (fig. 25 et 26). Il nous est arrivé de trouver dans ces mitochondries volumineuses une plage claire renfermant des rosettes de granules de 250 Å comme dans l'hélice principale de la pièce intermédiaire (fig. 25). Plus fréquemment, ces mitochondries enserrent des plages du fond cytoplasmique avec des vésicules de réticulum endoplasmique (fig. 24), comme nous l'avons déjà signalé à propos de la spermatide.

2.3. LE CHONDRIOME AU COURS DE LA SPERMATOGENESE D'AUTRES PULMONES

L'étude de la spermatogenèse chez *Helix pomatia* (fig. 12) et *Limnea stagnalis* (fig. 13) montre une évolution mitochondriale semblable à celle que nous avons décrite chez *Helix aspersa* et notamment l'apparition d'éléments figurés dans la pseudomatrice des mitochondries. Des variations secondaires s'observent néanmoins. Ainsi, chez la Limnée la population mitochondriale reste homogène dans la spermatide et nous n'avons pas observé de fibrilles dans la pseudomatrice, le contenu de celle-ci se présentant toujours sous son aspect grenu (fig. 13).

Dans le spermatozoïde d'autre part, le nombre des hélices secondaires et des canaux paraflagellaires (hélices principales), ainsi que celui des nervures de la surface de la pièce intermédiaire sont différents selon les espèces (publication n° 7 de l'annexe)

2.4. DISCUSSION

Si les principales étapes morphologiques de l'évolution mitochondriale des cellules séminales des Pulmonés étaient connues à la suite du travail de Grassé et coll. (1956), c'est André (1962) qui démontra l'ampleur des remaniements des macromolécules dont il est constitué.

Nos observations précisent certaines étapes de ces remaniements, concernant notamment l'édification du cristal et des canaux ; elles nous conduisent à compléter et à discuter les interprétations des précédents auteurs.

2.4.1. LA PSEUDOMATRICE

Dès le stade spermatocyte, l'architecture mitochondriale se modifie. Il s'agit d'abord *de modifications du pouvoir osmotique* (André, 1962) semblables à celles que cet auteur a décrites chez le rat et au cours desquelles les crêtes se dilatent tandis que la matrice se condense. Cependant, André avait signalé la présence dans la substance claire ou pseudomatrice, qui remplit les crêtes dilatées, de fibrilles et de grains. Bien qu'il ne les ait observés que dans quelques mitochondries, André avait supposé leur généralité et les avait interprétés comme représentant un transfert de substance dont il ne put déterminer la nature ni le sens, ces structures disparaissant par la suite. Nos observations montrent que ces éléments fibrillaires se rencontrent dans la plupart des mitochondries de la spermatide au début de son évolution. L'abondance de ces fibrilles est proportionnelle au développement de la pseudomatrice et correspond à une réduction du nombre des crêtes. Ces observations nous conduisent à envisager l'hypothèse que les fibrilles de la pseudomatrice proviennent de la ségrégation de certaines macromolécules des membranes. Le stade fibrillaire n'est probablement qu'une étape de ces transformations macromoléculaires plus complexes. En effet, à partir du moment où les mitochondries ainsi modifiées se groupent autour du flagelle, les fibrilles ne sont plus décelables dans la pseudomatrice qui contient alors une substance à texture grenue. Cette dernière augmente l'opacité de la pseudomatrice qui devient parfois presque aussi dense que la matrice (fig. 11 et 17). Nous avons tout lieu de penser que le stade diffus décrit par André correspond à cette étape. Chez la Limnée, les éléments figurés de la pseudomatrice se présentent directement sous l'aspect grenu : nous n'y avons jamais observé de fibrilles.

2.4.2. LA CRISTALLISATION ET LE CRISTAL

Au cours de la spermiogénèse, les remaniements mitochondriaux aboutissent selon André (1962) à une *"véritable métamorphose mitochondriale"* dont l'étape ultime consiste, comme il l'a montré, en la cristallisation d'une grande partie du matériel mitochondrial.

Il observe en effet que la masse presque amorphe, qui occupe les mitochondries au stade qu'il qualifie de "diffus", se réorganise en plans parallèles équidistants. Ces derniers sont disposés selon une architecture tridimensionnellement périodique dans laquelle les noeuds du réseau sont occupés par des globules de 90 Å de diamètre représentant les édifices macromoléculaires répétitifs du réseau cristallin.

Nos observations, qui confirment celles de Tahmisian (1964), montrent que c'est le matériel pseudomatriciel qui cristallise. Les premières unités macromoléculaires s'organisent, le long de la membrane mitochondriale externe selon des plans qui lui sont parallèles. La trace de ces premiers plans réticulaires principaux sur le plan de coupe est, soit une rangée de granules, soit une ligne continue (fig. 17).

Les plans réticulaires sont des surfaces courbes qu'il est possible d'identifier par les traces qu'ils laissent sur les plans de coupes. André a montré que les plans réticulaires principaux sont des "nappes cylindriques" concentriques. Nos observations conduisent à interpréter les plans B et C comme des surfaces hélicoïdales sub-orthogonales entre elles et aux plans A; le pas de l'enroulement hélicoïdal des plans B est très long et celui des plans C est très court (fig. c)

Chez le jeune spermatozoïde le noyau et la partie proximale de la pièce intermédiaire sont ceinturés d'un manchon de microtubules enroulés en hélice le long du spermatozoïde. Une telle disposition des microtubules est fréquente à ce stade de la différenciation des cellules sexuelles mâles. Kessel (1966) chez la guêpe et Anderson (1967) chez le ver de terre envisagent que ce dispositif joue un rôle important dans l'élongation du noyau. Le mécanisme de leur action n'est pas connu, toutefois Anderson envisage que la gaine de microtubules serait animée de mouvements synchrones qui provoquent l'extrusion du nucléoplasme et l'élongation du noyau.

Une telle conception du rôle des microtubules permet d'émettre l'hypothèse, que c'est par leur action, que se modèlerait la région antérieure du spermatozoïde des Pulmonés.

2.4.3. LES CONSTITUANTS MITOCHONDRIAUX FONDAMENTAUX

L'édification du réseau cristallin n'utilise qu'une partie du matériel mitochondrial comme l'a montré André (1962). Outre le cristal, le dérivé mitochondrial du spermatozoïde comprend des manchons constitués d'une substance très dense limitée par une membrane ; ces manchons ont été dénommés "*hélices secondaires*" par André.

Nos observations montrent que le matériel dense dont sont constituées les hélices secondaires dérive de la matrice ; la membrane qui les délimite provient de la membrane mitochondriale interne. Ces résultats confirment l'interprétation de Tahmisian (1964) pour qui "les bandes de membranes", intercalées entre les deux régions cristallisées, pourraient représenter ce qui subsiste des constituants non remaniés des mitochondries originelles.

2.4.4. L'HELICE PRINCIPALE

Cette région de la pièce intermédiaire ainsi dénommée par André (1962) correspond à la lacune para-axiale de Grassé et coll. (1956). Selon ces auteurs, ce compartiment, tout comme le cristal, se formerait à la suite des profonds remaniements qui affectent le dérivé mitochondrial au cours de la spermiogénèse. Nos observations montrent la présence de l'hélice principale dans la région antérieure de la spermatide dès la fusion des mitochondries en un seul dérivé (fig. 17). Mais en dépit du grand nombre de coupes examinées, nous n'avons pas pu observer les étapes de sa formation.

Cependant, l'étude de la région du col des spermatozoïdes montre que l'hélice principale prolonge, à l'intérieur du dérivé mitochondrial, l'entonnoir qui sépare la base du noyau de la région apicale de la pièce intermédiaire (fig. 60, 61, 63). L'hélice principale est donc un compartiment non mitochondrial invaginé en position intramitochondriale, l'ouverture étant obturée par le noyau.

Dans la spermatide et dans le jeune spermatozoïde, le contenu de l'hélice principale est morphologiquement très semblable à celui du hyaloplasme environnant. De telles insertions de hyaloplasme à l'intérieur d'invaginations mitochondriales se produisent au cours de l'élaboration du nebenkern des scorpions (André, 1959) et des insectes (André, 1962 ; Philipps, 1970), mais il ne s'agit que d'associations transitoires. Chez l'escargot au contraire, l'association persiste dans le spermatozoïde.

Au cours de la maturation du spermatozoïde, le contenu de l'hélice principale est profondément modifié ; ce compartiment est alors le siège d'un métabolisme particulier qui aboutit à l'accumulation de granules de 250 Å fortement colorables au plomb, dont nous avons démontré avec André la nature glycogénique (nous rappellerons ces résultats, objet de la publication n° 3 placée en annexe, dans le chapitre consacré à l'étude cytochimique

3. ETUDE CYTOCHIMIQUE ET CYTOENZYMOLOGIQUE

3.1. RESULTATS

Cette étude ayant fait l'objet des publications placées en annexe nous en indiquerons simplement ici les résultats principaux.

3.1.1. LES EXTRACTIONS ENZYMATIQUES

3.1.1.1. Les protéases (publication n° 1 de l'annexe)

Sur les spermatozoïdes incubés sans fixation on observe les résultats suivants :

La trypsine (fig. 28 et 29) fait disparaître la plupart des membranes et dissocie légèrement le cristal dont la structure devient plus visible. Certaines incidences de coupe montrent que le réseau est formé de globules de 95 Å de diamètre reliés en files par de courts pédicules (fig. 29). Les coupes bien perpendiculaires aux files de globules montrent que ceux-ci présentent un centre clair de 30 Å de diamètre. Les hélices secondaires sont très éclaircies et ne possèdent pratiquement plus que leur membrane limitante. Dans l'hélice principale, les granules de glycogène sont mieux individualisés, la substance intergranulaire ayant disparu.

La pan-protéase (fig. 30) a une action plus poussée. On observe une dilatation importante de la pièce intermédiaire. Le cristal devient moins bien ordonné ; ses éléments subsistent sous la forme de fins filaments. Les hélices sont vidées de leur contenu.

La papaïne fait disparaître complètement le cristal. Il ne reste plus, de la pièce intermédiaire, que l'axe flagellaire entouré de feuillets membraneux concentriques. Après cette action il est très difficile de reconnaître les différentes régions.

La pepsine a une action très intense. Après 15 minutes de traitement par une solution à 0,1 mg/ml, on assiste au début de l'action enzymatique : certains spermatozoïdes encore presque intacts voisinent avec des spermatozoïdes fortement dégradés (fig. 32). Au bout d'une demi-heure tous les spermatozoïdes sont attaqués et il n'en subsiste que de nombreuses vésicules membraneuses qui proviennent vraisemblablement de la réassociation en vésicules des membranes fragmentées par l'enzyme.

La sensibilité du cristal à la pepsine se retrouve lorsque l'on fait agir l'enzyme sur des coupes de spermatozoïdes inclus au glycol-méthacrylate. La pièce intermédiaire est considérablement dilatée et le cristal disparaît (fig. 33 et 34).

3.1.1.2. *Les amylases*

Lorsqu'on les fait agir sur bloc, la salive et l' α -amylase n'ont qu'une action très limitée sur les cellules non fixées. Mais si la digestion amylasique est précédée d'une digestion trypsique, le matériel granulaire de l'hélice principale disparaît totalement, alors qu'une digestion trypsique seule ne fait que disloquer l'amas des grains, ceux-ci devenant alors plus visibles (fig. 28).

Sur coupes de spermatozoïdes doublement fixés par le glutaraldéhyde et l'acide osmique, inclus en Epon et réoxydés avant action de l'enzyme selon la technique de Monneron et Bernhard (1966), l' α -amylase fait disparaître les granules de l'hélice principale au bout de 12 heures d'action (fig. 49). Sur les coupes témoin flottées sur l'eau distillée, le contenu de l'hélice principale n'est pas modifié (fig. 48).

3.1.2. ACTION DU MELANGE DELIPIDANT METHANOL-CHLOROFORME (publication n° 1 de l'annexe)

Après 24 heures d'incubation dans le mélange de Keilig on peut voir que l'ensemble du matériel de la pièce intermédiaire subsiste, notamment le cristal ; seule l'enveloppe externe est désorganisée (fig. 31).

3.1.3. MISE EN EVIDENCE DU GLYCOGENE PAR LA REACTION ACIDE PERIODIQUE-THIOSEMICARBAZIDE-PROTEINATE D'ARGENT.

Les caractères cytochimiques du contenu de l'hélice principale et principalement sa forte coloration par le réactif de Schiff après oxydation périodique nous indique qu'il est riche en glycogène (préliminaire III).

Après oxydation périodique puis traitement court (30 minutes) par la thiosemicarbazide, le protéinate d'argent se fixe de façon spécifique sur les granules de 250 Å de diamètre (fig. 50 et 51) qui remplissent l'hélice principale (Anderson et Personne ; 1970) et dont nous avons précédemment indiqué qu'ils étaient fortement opacifiés par les sels de plomb (fig. 23). Pour les traitements courts par la thiosemicarbazide (30 minutes), Thiéry (1967) a montré que la réaction acide périodique thiosemicarbazide protéinate d'argent ne révélait pratiquement que le glycogène.

Dans les spermatozoïdes en cours de maturation, les granules sont peu nombreux et groupés en rosettes (fig. 51). Dans les spermatozoïdes matures, les granules occupent pratiquement tout le volume de l'hélice principale (fig. 50)

Des granules AP-TSC-PA positifs (Acide Périodique - Thiosemicarbazide - Protéinate d'Argent) sont présents également dans l'axonème, à l'emplacement des fibres secondaires (Personne, 1968; Anderson et Personne, 1970). Nous en donnons une description plus approfondie dans un travail annexe (Personne, en préparation)

Chez la Limnée et le Planorbe, une couronne de granules AP-TSC-PA entoure le flagelle au niveau de la queue du spermatozoïde (Anderson et Personne, 1970).

3.1.4. RECHERCHE DES DESHYDROGENASES

3.1.4.1. Les déshydrogénases mitochondriales (publication n° 2 de l'annexe)

En présence d'un substrat convenable, succinate (fig. 39, 41 et 43), α -glycérophosphate, NADH₂ (fig. 44), D L-isocitrate + NAD, α -cétoglutarate + NAD, L-malate + NAD,

β -hydroxybutyrate + NAD, la pièce intermédiaire des spermatozoïdes des Gastéropodes Pulmonés est capable de réduire le NBT (fig. 39) le TNBT ou le TC-NBT (fig. 41, 43, 44). Le formazan ne se forme que lorsque le milieu contient le substrat, ce qui permet d'éliminer l'hypothèse d'une réduction aspécifique des sels tétrazolium. Il se localise exclusivement sur la ou les strates matriciels (hélices secondaires).

Le dérivé mitochondrial du spermatozoïde possède donc les enzymes ou systèmes enzymatiques capables de déshydrogéner les substrats cités précédemment pour le porter sur le tétrazolium. Ce sont respectivement, selon Novikoff (1963), les systèmes succinate-tétrazolium réductase, glycérophosphate-tétrazolium réductase, NADH₂-tétrazolium réductase, DL-isocitrate : NAD-tétrazolium réductase, α -cétooglutarate : NAD-tétrazolium réductase, L-malate : NAD tétrazolium réductase, et β -hydroxybutyrate : NAD tétrazolium réductase. La méthode cytochimique utilisée pour ces recherches ne permet la localisation précise que des systèmes succinate, tétrazolium réductase et NADH₂ tétrazolium réductase. Pour les autres activités tétrazolium réductasique liées au NAD, le formazan formé correspond au site de la NADH₂ tétrazolium réductase normalement associée à la déshydrogénase.

3.1.4.2. *Les enzymes glycolytiques : D-glycéraldéhyde-3-phosphate NAD oxydoréductase (GAPD) et L-lactate : NAD oxydoréductase (LDH)*

Après incubation de spermatozoïdes à l'état frais ou après une brève fixation (5 à 10 minutes) dans le glutaraldéhyde à 2% dans le milieu de Fahimi et Karnovsky (1966) contenant du TNBT, du Phénazinéméthosulfate (PMS) et comme substrat du DL-glycéraldéhyde 3-phosphate ou du lactate de lithium, les dépôts de formazan apparaissent dans la matrice et le compartiment de glycogène (fig. 54). En l'absence de PMS le produit de réaction apparaît seulement sur la matrice ; il est absent dans le compartiment de glycogène.

Les spermatozoïdes incubés en présence de TNBT et de PMS mais en l'absence de substrat ne présentent pas de dépôts de formazan.

Les spermatozoïdes qui sont préincubés dans un milieu contenant de l'iodoacétate, inhibiteur de la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase ne montrent aucune activité GAPD (fig.55)

Le phénazinéméthosulfate (PMS) paraît jouer un rôle important dans la démonstration des déshydrogénases glycolytiques. Ce n'est qu'en présence de PMS dans le milieu d'incubation que les dépôts de formazan apparaissent dans le compartiment de glycogène. Le PMS agissant comme transporteur d'électron intermédiaire permet la démonstration de la déshydrogénase spécifique en court circuitant la NAD-tétrazolium réductase liée (diaphorase) (Farber et coll., 1956 ; Fahimi et Amarasingham, 1964 ; Fahimi et Karnovsky, 1966). En l'absence de PMS l'activité tétrazolium réductasique dans la matrice est augmentée.

3.1.4.3. *La sorbitol déshydrogénase* (publication n° 6 de l'annexe)

La présence de cette enzyme n'a pu être montrée que sur des spermatozoïdes incubés à l'état frais. Après 60 minutes d'incubation dans le milieu au sorbitol nitro BT NAD, les dépôts de formazan révélant l'activité de la sorbitol déshydrogénase sont localisés au niveau des grosses fibres striées externes du flagelle et aux strates de matrice constituant les hélices secondaires (fig. 46 et 47). Les spermatozoïdes incubés en l'absence de sorbitol n'ont pas de dépôts (fig. 45).

3.1.5. *OXYDATION DE LA DAB* (publication n° 7 de l'annexe)

Des fragments d'ovotestis sont légèrement fixés par le glutaraldéhyde (15 minutes) puis incubés dans la 3,3' diamino-benzidine, soit en présence de cytochrome c à pH 7,4 (milieu de Seligman et coll., 1968) soit en présence d'une très petite quantité d' H_2O_2 à pH 6 (milieu de Novikoff et Goldfischer, (1969) pour la réaction mitochondriale). L'examen au microscope électronique montre dans de telles préparations une opacification de la paroi des crêtes et de l'espace intracrystal des mitochondries des spermatocytes (fig. 35), de la pseudomatrice des mitochondries de la spermatide (fig. 38) et du cristal mitochondrial du spermatozoïde (fig. 36). L'opacification des crêtes et de l'espace intracrystal n'existe pas lorsque le milieu d'incubation contient du cyanure (fig.37).

3.1.6. *LES ATPases* (publication n°7 de l'annexe)

L'activité ATPasique n'est démontrable que dans le flagelle du spermatozoïde; aucune activité n'a pu être décelée dans le dérivé mitochondrial de la pièce intermédiaire.

La démonstration de l'ATPase du spermatozoïde de l'Escargot nécessite que ces cellules soient en état de motilité, que l'enzyme ne soit pas détruite par une fixation prolongée par le glutaraldéhyde et que les ions Mg^{++} soient présents dans le milieu.

L'enzyme activable par les ions Ca^{++} n'a pas été détectée, même après une incubation prolongée.

Après 15 minutes d'incubation dans le milieu de Wachstein et Meisel (1957) ou de Padykula et Gauthier (1963) (*ATPase activée par les ions Mg^{++} à pH 7,2*) les dépôts de phosphate de plomb sont localisés autour des tubules centraux du flagelle et entre les grosses fibres externes (publication n°5 de l'annexe). Après 30 minutes d'incubation les dépôts obscurcissent complètement l'axonème. .

3.1.7. *LA GLUCOSE-6-PHOSPHATASE* (publication n°5 de l'annexe)

Après 15 minutes d'incubation dans le milieu de Chiquione (1953) de spermatozoïdes à l'état frais ou très légèrement fixés au glutaraldéhyde, les dépôts de phosphate de plomb sont spécifiquement localisés à la membrane qui limite les strates matricielles dans la pièce intermédiaire (fig. 56 et 58). De nombreux dépôts se trouvent aussi dans le flagelle, entourant les grosses fibres externes et les 2 tubules centraux. Après incubation dans le milieu dépourvu de glucose 6-phosphate, le flagelle et l'enveloppe des hélices secondaires sont dépourvus de dépôts (fig. 57 et 59). Quelques dépôts non spécifiques peuvent recouvrir la surface du spermatozoïde.

3.1.8. *L'AMYLOPHOSPHORYLASE ET SON SYSTEME REGULATEUR: PHOSPHORYLASE PHOSPHATASE ET PHOSPHORYLASE KINASE* (publication n°4 de l'annexe).

Pour cette recherche, les spermatozoïdes vivants sont incubés dans un milieu contenant du glucose 1-phosphate. La majeure partie de l'amylophosphorylase se trouvant sous la forme inactive *b* n'est décelable qu'après transformation en forme active *c*

sous l'action de la phosphorylase kinase en présence d'ATP et de Mg^{++} (milieu de Guha et Wegmann, 1959).

L'examen comparatif en microscopie électronique après traitement par l'acide périodique thiosemicarbazide protéinate d'argent de coupes de spermatozoïdes incubés dans le milieu témoin sans G 1-P montre un accroissement du stock de glycogène préexistant indiquant qu'il y a eu synthèse de glycogène durant l'incubation en présence de G 1-P. Dans le compartiment de glycogène du dérivé mitochondrial, les particules bien individualisées dans les spermatozoïdes témoin (fig. 52) ne sont plus discernables dans les spermatozoïdes incubés en présence de G 1-P (fig. 53). Dans l'axonème on observe un accroissement considérable de la taille des particules associées aux fibres secondaires (fig. 53).

L'examen en microscopie ordinaire après coloration par l'iode indique que les chaînes du glycogène préexistant se sont allongées au cours de l'incubation dans le milieu contenant du G 1-P.

3.2. DISCUSSION

3.2.1. *LE CRISTAL*

La sensibilité du cristal envers les protéases: pepsine, pan-protéase, papaïne et sa résistance aux agents délipidants confirment l'hypothèse d'André (1962) sur sa nature protéique.

Les globules constitutifs du cristal présentent une certaine ressemblance morphologique, déjà signalée par André (1962, 1965), avec la tête des particules élémentaires décrites pour la première fois par Fernandez-Moran (1962) et retrouvées depuis par de nombreux auteurs. Cette ressemblance est particulièrement visible après action de la trypsine. En dilacérant légèrement le cristal, cette enzyme met en évidence des globules de 95 Å de diamètre réunis en files par de courts pédicules (fig. 24). Les globules ont un centre clair de 30 Å. L'étude cytoenzymologique du cristal mitochondrial de la pièce intermédiaire du spermatozoïde des Pulmonés montre cependant que ses activités sont différentes de celles de la tête des particules élémentaires des mitochondries de mammifères.

En effet, il est bien établi maintenant (Chance et coll., 1964; Stasny et Crane, 1964), que la tête des particules élémentaires ne renferme pas les constituants de la chaîne respiratoire comme Green et coll. (1963) en avaient tout d'abord émis l'hypothèse; ces enzymes respiratoires se localiseraient dans la pièce basale des particules élémentaires et seraient partie intégrante de la membrane des crêtes. Par contre, Racker et coll. (1965), Kagawa et Racker (1966) ont montré que la tête des particules élémentaires correspond au facteur de couplage dit F_1 dont Pullman et coll. (1960) ont mis en évidence l'activité ATPasique. Les résultats d'Oda et Seki (1966), Tzagoloff et coll. (1968) confirment l'identité entre la tête des particules élémentaires et l'ATPase mitochondriale.

Le cristal du dérivé mitochondrial du spermatozoïde des Pulmonés au contraire ne possède pas d'activité ATPasique cytochimiquement décelable et nous avons tout lieu de penser qu'il renferme les cytochromes. En effet, Ritter et André (non publié) ont observé par spectrophotométrie que les spermatozoïdes matures conservent sous une forme active la totalité de la chaîne des transporteurs d'électrons. Ils ont mesuré une augmentation de la concentration en cytochromes a, a_3 , b après trypsinisation, traitement qui n'affecte pratiquement pas le cristal, ce qui suggère une localisation des cytochromes sur le cristal.

Cette hypothèse est renforcée par l'observation d'une intense activité oxydasique dans la pseudomatrice des mitochondries de la spermatide et sur le cristal du spermatozoïde comme le révèle la réaction à la DAB.

Cette réaction, introduite par Graham et Karnovsky (1966) pour révéler la peroxydase a été utilisée par Seligman et coll. (1968) pour mettre en évidence la cytochrome oxydase des mitochondries. Dans les conditions d'incubation qu'ils emploient (pH 7,4), ils observent que le produit d'oxydation de la DAB se localise à la surface de la membrane interne et que la réaction est absente en présence d'un inhibiteur de la cytochrome oxydase, le cyanure. Novikoff et Goldfischer (1969), Beard et Novikoff (1969) signalent que c'est à pH 6 que l'oxydation mitochondriale de la DAB est la plus intense et qu'elle se produit aussi à la surface de la membrane externe. Selon ces auteurs, la réaction de la membrane externe résulterait de l'action du cytochrome b_5 qui y est contenu (Sottocasa et coll., 1967), la réaction des

crêtes et de la membrane interne étant due au cytochrome c. C'est également au cytochrome c endogène que Karnovsky et Rice (1969) attribuent la réaction mitochondriale. Il s'agirait pour ces auteurs de l'action peroxydasique du cytochrome c. Celle-ci se manifeste avec intensité sur H_2O_2 comme l'a montré Flatmark (1965) en présence de certains anions (chlorure, acétate, citrate) et à bas pH. Dans ces conditions, Karnovsky et Rice (1969) observent que la DAB est directement oxydée par le cytochrome c exogène qu'ils emploient comme traceur des ultrastructures. Récemment Roels (1970) a montré que dans les mitochondries d'ovocytes d'*Artemia* la réaction résulte de l'action combinée du cytochrome c et de son oxydase. Il observe en effet le blocage de la réaction par les inhibiteurs de la cytochrome oxydase, cyanure et azide de sodium et une forte diminution d'intensité après extraction du cytochrome c, l'adjonction de cytochrome c exogène redonnant alors à la réaction son intensité normale. Il constate également que l'activité peroxydasique du cytochrome c n'est pas en cause. En effet, la réaction ne résiste pas lorsque l'on élève la température à 90° C pendant 10 minutes, alors que ce traitement a tendance à augmenter l'action peroxydasique du cytochrome c. En conclusion, Roels suppose que la DAB est oxydée directement par le cytochrome c dont la forme réduite est ensuite oxydée par la cytochrome oxydase; le produit d'oxydation de la DAB serait alors précipité au site du cytochrome c. Cette interprétation confirme celle de Seligman et coll. (1968).

Il ressort de cette analyse que la réaction à la DAB des mitochondries ne peut-être considérée comme spécifique de la cytochrome oxydase mais permet de localiser les sites du cytochrome c.

3.2.2. LE COMPARTIMENT MATRICIEL

Il est généralement considéré que les enzymes du cycle tricarboxylique sont localisées dans la matrice des mitochondries banales; les déterminations biochimiques les montrent en effet dans la fraction dite soluble des mitochondries rupturées.

En dépit des profondes transformations que subissent les mitochondries au cours de la spermatogenèse des Pulmonés, le dérivé mitochondrial du spermatozoïde garde dans son compartiment matriciel, les enzymes du cycle de Krebs fonctionnelles.

Les complexes succinate-tétrazolum réductase et NADH_2 -tétrazolum réductase se trouvent également dans le compartiment matriciel du dérivé mitochondrial du spermatozoïde. Cette localisation est inhabituelle. Ogawa et Barrnett (1965), Seligman et coll. (1967), Ogawa et coll. (1968), Tsou et coll. (1968), Kalina et coll. (1969), Kalina et coll. (1971) utilisant la voie cytochimique observent en effet la répartition de ces enzymes à la surface des crêtes des mitochondries banales. De même Lehninger (1964) utilisant la voie biochimique a montré que les activités succino-déshydrogénasiques et NADH_2 cytochrome c réductasiques sont localisées sur la membrane interne avec les autres constituants de la chaîne respiratoire. Il y a tout lieu de penser que cette situation exceptionnelle résulte d'un compartimentage des macromolécules membranaires qui se sont ségréguées au cours de la spermatogenèse : certaines d'entre elles, dont la cytochrome oxydase, constituent le cristal, d'autres, dont la succino-déshydrogénase et la NADH_2 -déshydrogénase, migrent dans la matrice. Une telle séparation des enzymes membranaires est réalisable par l'action de certains détergents sur des mitochondries isolées. L'alcool amylique a été utilisé par Green et coll. (1955) pour séparer le complexe succino-déshydrogénasique du complexe cytochrome oxydasique. Le triton X114 permet de séparer les constituants des crêtes en deux fractions dont l'une contient les cytochromes rouges b et c_1 et l'autre les cytochromes verts a (Jacobs et coll., 1966; Prezbindowski et coll., 1969). L'examen des fractions au microscope électronique, conduit Prezbindowski et coll. à envisager que la membrane des crêtes est composée de deux couches lipoprotéique avec les cytochromes b et c_1 et les déshydrogénases associées sur la couche interne, et les cytochromes a et a_3 sur la couche externe.

La sorbitol déshydrogénase a été mise en évidence par Bishop (1967) dans les cellules germinales mâles de nombreux Vertébrés et Invertébrés où son activité augmente avec l'âge des individus au fur et à mesure de la différenciation germinale. Il est intéressant de remarquer qu'en dépit d'une évolution toute différente cette activité enzymatique se localise, comme chez le cobaye, sur le chondriome.

La membrane qui délimite le compartiment matriciel possède une activité glucose-6-phosphatasique. La glucose-6-phosphatase de cette membrane peut servir à contrôler la pénétration, dans le compartiment matriciel, du glucose nécessaire à la synthèse du sorbitol par l'aldose réductase (Mann, 1964). Elle régulerait ainsi l'activité de la sorbitol déshydrogénase (publication n°6 de l'annexe). A l'appui de cette hypothèse, il est à remarquer que la glucose-6-phosphatase est également présente dans l'axonème des spermatozoïdes et se localise autour des grosses fibres externes, qui renferment précisément une sorbitol déshydrogénase.

3.2.3. L'HELICE PRINCIPALE ET LE STOCKAGE DU GLYCOGENE

L'étude de la région du col du spermatozoïde nous a montré que l'hélice principale de la pièce intermédiaire, contrairement aux interprétations antérieures (André, 1962; publication n°3 de l'annexe), n'est pas de nature mitochondriale; il s'agit d'une invagination du fond cytoplasmique à l'intérieur du dérivé mitochondrial.

Au cours de la maturation des spermatozoïdes, le contenu de l'hélice principale acquiert des caractères morphologiques et cytochimiques indiquant la présence de glycogène. De tels canaux remplis de glycogène se retrouvent insérés entre les mitochondries dans la pièce intermédiaire du Géophile (Horstmann, 1968).

L'apparition progressive du glycogène et l'existence d'un système phosphorylasique et d'enzymes de la glycolyse, glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase et lactico déshydrogénase indiquent qu'il est métabolisé in situ. Nous avons tout lieu de penser que ces enzymes constituent une partie des protéines associées au glycogène; Wanson et Drochmans (1967) ont en effet montré qu'une fraction protéique possédant une activité phosphorylasique reste attachée aux particules de glycogène isolé du muscle strié. Cette fraction protéique constitue très certainement le réseau grisé qu'André a observé après inclusion au méthacrylat et coloration simple à l'acétate d'uranyle. C'est elle que fait disparaître la digestion par la trypsine, ce qui permet de mieux individualiser les particules (publication n°3 de l'annexe). Il est fort probable que la zone claire périglycogénique observée par Minio et coll. (1966) autour des particules de glycogène

hépatique après fixation glutaraldéhyde-osmium représente le même matériel.

C'est peut-être aussi en raison de l'existence de ce stock de glycogène que le dérivé mitochondrial possède une glucose-6-phosphatase. Cette enzyme contrôle en effet l'utilisation du glucose 6-phosphate dont le rôle est capital dans le métabolisme du glycogène (Nordlie, 1968). Il est intéressant de remarquer à ce sujet que cette enzyme microsomiale, inhabituelle dans les mitochondries, a été retrouvée par Anderson (1968) dans les mitochondries de l'oursin *Paracentrotus lividus* qui, précédemment, contiennent du glycogène.

4. DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

Notre étude montre,

- 1) d'une part que les remaniements du chondriome au cours de la spermatogénèse des Gastéropodes Pulmonés aboutissent à ségréger puis à compartimenter les enzymes de la chaîne respiratoire dans le dérivé mitochondrial du spermatozoïde.
- 2) d'autre part qu'un compartiment non mitochondrial persiste, invaginé dans le dérivé mitochondrial de la pièce intermédiaire et qu'il s'y élabore un abondant stock de glycogène durant la maturation du gamète.

Afin d'essayer de dégager la signification d'un tel complexe mitochondrial, il nous paraît nécessaire de replacer l'évolution mitochondriale des Gastéropodes Pulmonés dans le cadre plus général du devenir du chondriome au cours de la spermatogénèse.

4.1. ROLE DU CHONDRIOME DANS LE SPERMATOZOÏDE

Le spermatozoïde, terme de processus compliqués de différenciation, est considéré par Conklin (1924) et Cowdry (1924) comme l'une des cellules les plus différenciées des métazoaires. A l'issue de la spermatogénèse en effet, le gamète mâle ne possède plus qu'un nombre d'organites réduits et spécialisés. Il est dépourvu de l'appareil ribonucléoprotéique indispensable aux synthèses protéiques et son noyau ne contient plus que les désoxyribonucleoprotéines sous une forme condensée et dans un état d'inertie qui ne sera levé que par la fécondation. A l'exception des Nématodes, des Acariens, des Diplopodes et d'un Vertébré, le Téléostéen *Gymnarchus* (voir la revue de Favard et André, 1970) le centriole distal développe un flagelle, qui rend le gamète mâle mobile, et autour duquel se groupe le chondriome ou du moins la partie du chondriome destinée à rester fonctionnelle dans le spermatozoïde ; chez de nombreuses espèces il y a en plus un stock de glycogène (Anderson et Personne, 1970).

Cette organisation conduit à considérer avec Nelson (1967) que les capacités biosynthétiques qui persistent dans le spermatozoïde servent essentiellement à maintenir la production de l'ATP nécessaire à sa motilité.

L'importance du chondriome dans le spermatozoïde est variable et permet de distinguer deux types de spermatozoïdes (Retzius, 1904-1912) : l'un, qualifié de "primitif", dans lequel le chondriome est composé de 4 à 6 chondriosphères situées à la base du noyau et l'autre, qualifié "d'évolué", dans lequel le chondriome donne naissance à une pièce intermédiaire allongée. Ces spermatozoïdes correspondent à des modes de fécondation différents; Franzen (1956) remarque que le spermatozoïde de type primitif caractérise les espèces qui libèrent leur sperme directement dans l'eau. Dans les autres cas, lorsque la fécondation est interne ou lorsque le sperme est libéré au voisinage de l'orifice génital femelle, la morphologie des spermatozoïdes diffère plus ou moins du "type primitif". Les modifications affectent principalement la tête et la pièce intermédiaire. Le chondriome forme alors une gaine autour de l'axonème qui présente alors une couronne supplémentaire externe de grosses fibres. Ces fibres sont particulièrement bien développées dans le spermatozoïde des Pulmonés (Anderson et Personne, 1967). Elles renfermeraient des protéines contractiles, dont certaines de type myosine (Nelson, 1962) douées d'activité ATPasique (Nelson, 1962, 1967) Gordon et Barrnett, 1967) Anderson et Personne, 1969).

De par leur fonction de phosphorylation oxydative, les mitochondries sont les principaux générateurs d'ATP de la cellule et il est assez fréquent d'observer le groupement de ces organites aux sites d'utilisation de l'énergie. Dans la zone basale des cellules du tube contourné du rein notamment, les mitochondries sont régulièrement disposées entre les invaginations de la membrane plasmique (Sjostrand et Rhodin, 1953 ; Rhodin, 1954). C'est à ce niveau que se localiserait l'étape active de réabsorption du sodium. Cette réabsorption se fait, selon un mécanisme d'échange sodium-potassium, semblable à celui des cellules nerveuses et nécessite de l'énergie. L'orientation des mitochondries, le long de la zone de transport actif au travers de la membrane plasmique, suggère que les mitochondries sont indispensables au transport actif. Une disposition fonctionnelle semblable se retrouve dans le muscle. Dans les muscles du vol des Insectes en particulier

(Smith, 1968) et dans le muscle cardiaque, dont les activités sont particulièrement intenses, les mitochondries sont très nombreuses et régulièrement disposées en alternance avec les myofibrilles. De nombreuses particules de glycogène remplissent d'autre part le hyaloplasme entre les mitochondries.

L'organisation de la pièce intermédiaire laisse à penser qu'il y a, là aussi, agencement fonctionnel entre le chondriome, générateur de l'ATP, et les protéines contractiles du flagelle.

(Fawcett, 1958, 1962).

Chez les Gastéropodes Pulmonés, la pièce intermédiaire renferme de plus, inséré dans le dérivé mitochondrial, un abondant stock de glycogène auquel sont associées les enzymes de son catabolisme et notamment celles de la glycolyse. Ainsi se trouvent réunis en un seul complexe, autour des structures contractiles de l'axonème, le générateur d'ATP et le substrat énergétique. Le système peut alors fonctionner de façon autonome pendant une durée particulièrement longue, aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose et l'homologie avec le muscle est encore plus poussée. Une disposition analogue se retrouve chez les Myriapodes Chilopodes (Horstmann, 1968). Chez les mammifères au contraire, le système est dépendant de la fourniture de substrats oxydables (fructose) par le liquide séminal.

4.2. LES REMANIEMENTS DES STRUCTURES MITOCHONDRIALES

Outre sa polarisation autour du flagelle, le chondriome des cellules séminales subit des remaniements structuraux plus ou moins complexes au cours de la spermatogénèse. Ceux-ci affectent l'ensemble du chondriome et suivent des mécanismes variables mais strictement définis selon les espèces.

4.2.1. SIGNIFICATION PHYLOGENIQUE

Si, d'une façon générale la morphologie du chondriome dans le spermatozoïde est essentiellement déterminée par le mode de fécondation, certaines transformations mitochondriales de la spermatogénèse et l'architecture du dérivé qui en résulte dans le spermatozoïde constituent des critères systématiques extrêmement précis, comme l'a montré André (1963) au sujet des Scorpions et dont les Gastéropodes nous offrent un autre exemple (publication n° 7 de l'annexe).

Ces animaux sont divisés en Streptoneures ou Prosobranches et en Euthyneures où sont rassemblés Opisthobranches et Pulmonés. Déjà, par examen au contraste de phase, Franzen (1955) avait remarqué des similitudes dans la morphologie des spermatozoïdes des Opisthobranches et des Pulmonés. Ces similitudes sont particulièrement apparentes par opposition aux Prosobranches dont la spermiogénèse et le spermatozoïde sont totalement différents.

A l'échelle des ultrastructures, nous remarquons, tout comme chez les Pulmonés que la pièce intermédiaire du spermatozoïde des Opisthobranches possède un dérivé mitochondrial muni d'un cristal et un compartiment à glycogène. Mais à la différence des Pulmonés chez lesquels le corps mitochondrial est unifié, les mitochondries sont simplement réunies par le raccordement de leurs membranes externes et gardent leur individualité. Chez les Prosobranches, la pièce intermédiaire est dépourvue de matériel mitochondrial cristallisé et de compartiment à glycogène. Les mitochondries, réunies en un manchon, restent individualisées ; leurs crêtes, dont l'abondance varie avec les espèces, sont disposées perpendiculairement à l'axe de l'organite, selon une architecture caractéristique décrite par Kaye (1958) chez la Paludine. Nos observations confirment les conceptions de Franzen et montrent d'une part que l'édification du cristal mitochondrial dans l'espace intermembranaire dilaté et d'autre part que l'existence du compartiment à glycogène associé au dérivé mitochondrial dans la pièce intermédiaire sont caractéristiques du spermatozoïde des Gastéropodes Euthyneures.

4.2.2. SIGNIFICATION FONCTIONNELLE

Si l'édification de la pièce intermédiaire résulte d'un agencement fonctionnel comme dans le muscle, entre l'utilisateur de l'ATP (protéines axonématiques) et son générateur (mitochondries), l'organisation mitochondriale y est différente.

La structure des mitochondries étant étroitement dépendante de leur fonction, il y a lieu de se demander quelle peut-être l'efficacité des mitochondries modifiées des cellules séminales. Selon André (1962) *c'est probablement vers un ralentissement d'activité que tendent ces modifications* qui amènent une concentration plus ou moins importante du matériel mitochondrial.

Il est à remarquer à ce sujet que plus les remaniements sont importants, plus le dérivé mitochondrial du spermatozoïde est développé. En effet, lors de l'édification des spermatozoïdes de type primitif il s'agit essentiellement d'une dilatation des crêtes et d'une condensation de la matrice, mais des transformations plus importantes affectent le chondriome des espèces à fécondation interne, où une pièce intermédiaire allongée se développe. Dans la plupart des cas, notamment chez les Vertébrés, il se produit alors des remaniements plus ou moins importants de l'architecture des crêtes, mais l'organisation mitochondriale fondamentale persiste la pièce intermédiaire n'entoure jamais qu'une portion du flagelle. Dans un certain nombre de cas par contre, qui semblent limités aux Gastéropodes et à une partie des Arthropodes, une architecture nouvelle s'organise ; le dérivé mitochondrial des spermatozoïdes s'étend alors sur la presque totalité du flagelle. Ces constatations conduisent à penser que le plus ou moins grand développement de la pièce intermédiaire dans le spermatozoïde puisse compenser la perte d'efficacité des mitochondries modifiées qui la constituent. Un tel phénomène de compensation a été envisagé par Gustafsson et coll. (1965) à propos des mitochondries du muscle squelettique du rat thyroïdectomisé. Dans ce cas, l'absence de thyroïde entraîne une diminution importante du pouvoir oxydatif et phosphorylant des mitochondries et on observe en même temps un accroissement du nombre et de la taille des mitochondries.

Dans les mitochondries banales, les enzymes de l'oxydation phosphorylante font partie de la membrane interne. Chez les Insectes et chez les Gastéropodes Euthyneures, la surface de la membrane interne, dans le dérivé mitochondrial du spermatozoïde, est très réduite et l'essentiel du volume est occupé par un cristal.

Des formations périodiques bi-ou tridimensionnelles ont été observées à l'intérieur de mitochondries dans des tissus variés (voir l'inventaire dressé par Suzuki et Mostofi, 1967 ; Yamamoto et coll. 1969). La plupart de ces inclusions sont localisées dans la matrice. Elle se présentent soit sous l'aspect de paquets de filaments parallèles, soit sous celui de grains en groupes à contour géométrique, soit comme une alternance de rangées de grains et de feuilletés ondulés ou arqués. La taille de ces inclusions est variable. Les sous-unités constitutives ont un diamètre qui se situe entre 30 et 120 Å, avec des espacements de centre à centre compris entre 50 et 200 Å. Sternlieb et Berger (1969) ont étudié

par diffraction les inclusions cristallines des mitochondries d'hépatocytes humains normaux et pathologiques. Ils concluent que ces inclusions sont des cristaux dont la maille est parallélipédique et mesure $156 \text{ \AA} \times 156 \text{ \AA} \times 130 \text{ \AA}$. La maille est la même, que les inclusions proviennent des mitochondries de sujets normaux ou pathologiques ; ce résultat est interprété comme l'indication d'une identité de composition chimique de ces différents cristaux. Les mesures de diffraction optique effectuées par Sternlieb et Berger indiquent que ces inclusions ne sont pas des cristaux phospholipidiques, mais qu'ils sont probablement constitués de grosses molécules protéiques ou éventuellement de micelles phospholipidiques. Haust (1968) a envisagé la possibilité que ces cristaux matriciels des mitochondries hépatocytaires proviennent des crêtes mitochondriales. Cette interprétation a également été avancée par Garreau de Loubresse (1967) à propos des inclusions matricielles cristallines des mitochondries de la spermatide d'un Entomostracé, le *Tanymastix lacunae* et par Gharagozlou (1969) pour les inclusions matricielles cristallines des mitochondries du tissu adipeux de la Blatte. On ne dispose actuellement d'aucune preuve d'une telle origine et en l'absence d'étude cytochimique, la nature et la fonction de ces inclusions reste énigmatique.

D'autres inclusions de matériel ordonné ont été signalées à l'intérieur des crêtes ou dans l'espace intermembranaire. Mugnaini (1964), Svoboda et Higginson (1964), Porta et coll. (1965) ont montré la présence de filaments hélicoïdaux à l'intérieur des crêtes mitochondriales dilatées dans des cellules gliales et dans des hépatocytes. Mugnaini envisage que ces filaments représentent des macromolécules probablement protéiques synthétisées dans ces mitochondries. Dans les ovocytes de Batraciens, Ward (1962), Karasaki (1963) ont décrit la présence, dans des crêtes mitochondriales dilatées, de cristaux qu'ils considèrent comme une étape de la formation du vitellus protéique. Massover (1970) a montré que ces cristaux proviennent d'une différenciation locale des mitochondries ; les remaniements, limités à certaines régions des mitochondries, affectent tout d'abord la matrice puis certaines crêtes se dilatent et renferment un matériel dense qui cristallise. Les transformations

n'affectent qu'une partie de la mitochondrie et les cristaux sont ensuite libérés dans le cytoplasme, entourés par une fraction de la membrane mitochondriale externe; ils se transforment en plaquettes vitellines. Chez la Planorbe, Carasso et Favard (1958) et Favard et Carasso (1958) ont également observés la participation des mitochondries à l'élaboration des plaquettes vitellines. Le mécanisme y est différent; il y a alors transformation de l'ensemble de la mitochondrie dont toutes les structures disparaissent.

Dans un certain nombre d'affections myopathiques, Luft et coll. (1962), Sky et coll. (1966), Kintz (1966), Gonatas et coll. (1967), Grunner (1963), Norris et Panner (1966), Price et coll. (1967) ont observé la présence dans des mitochondries modifiées de matériel périodique cristallin. Dans le cas décrit par Luft et coll. (1961), l'étude biochimique montre des dérèglements fonctionnels au niveau du chondriome en ce qui concerne le couplage de la phosphorylation aux oxydations.

Durant la spermatogénèse des Insectes et des Gastéropodes Euthyneures, l'ensemble de la population mitochondriale est remanié et à la suite de *métamorphoses mitochondriales* une partie des macromolécules se réorganise en un cristal (André, 1962). Afzelius (1970) considère que ces cristaux représentent des structures dégénérées ou un stockage de substance.

Les propriétés du matériel cristallin sont différentes pour les deux dérivés mitochondriaux. Chez les Insectes, le cristal est matriciel, de structure hexagonale (Philipps, 1966, 1970; Perotti, 1969) et s'il est bien de nature protéique, il ne présente pas d'activité oxydasique décelable par la diaminobenzidine (Bigliardi et coll., 1970; Anderson et Personne, non publié). Chez les Pulmonés au contraire, le cristal remplit l'espace intermembranaire ou pseudomatriciel, sa maille est parallélépipédique. La propriété qu'il possède d'oxyder la diaminobenzidine, dans les conditions de la réaction mitochondriale, permet d'y localiser le cytochrome c et renforce l'hypothèse d'André sur l'origine de ce matériel cristallin à la suite d'une ségrégation des macromolécules des crêtes. Cette ségrégation s'accompagne d'un compartimentage des enzymes respiratoires qui restent néanmoins fonctionnelles comme ont pu le vérifier Ritter et André (non publié) par spectrophotométrie.

Les résultats de cette étude ne fournissent de renseignements que sur les capacités oxydasiques de ces mitochondries, mais nous ne possédons aucune donnée sur l'efficience d'une telle mitochondrie du point de vue de la phosphorylation oxydative. Il est intéressant cependant de remarquer à ce sujet, d'une part l'absence d'activité ATPasique mitochondriale cytochimiquement décelable et d'autre part que le cristal mitochondrial du spermatozoïde des Gastéropodes Euthyneures présente de fortes similitudes, dans sa localisation et dans sa structure, avec les formations périodiques observées dans certaines affections myopathiques. Luft et coll. considèrent en effet, que ces dernières résultent de dérèglements du couplage de la phosphorylation aux oxydations.

Il se peut que les remaniements de l'architecture mitochondriale au cours de la spermatogénèse des Gastéropodes Euthyneures traduisent de telles modifications du fonctionnement mitochondrial, qui seraient dans ce cas une étape physiologique normale. Pour pouvoir étayer une telle hypothèse, il est nécessaire que nous entreprenions maintenant l'étude physiologique de ces spermatozoïdes.

Au moment de leur libération, les spermatozoïdes des Gastéropodes Pulmonés sont pratiquement immobiles. Ils sont alors stockés dans le réceptacle séminal du conjoint où ils demeurent actifs après plusieurs années (Taylor, 1900) et où leurs besoins énergétiques sont probablement très faibles jusqu'à la fécondation.

La nouvelle organisation du dérivé mitochondrial pourrait ainsi permettre la mise en réserve de la machinerie enzymatique dans l'attente d'une reprise d'activité au moment de la fécondation.

Cet état d'inertie peut également rendre compte de l'orientation du métabolisme vers le stockage des métabolites oxydables en glycogène, lors de la maturation des spermatozoïdes.

Il y a donc lieu de penser que l'évolution du chondriome durant la spermatogénèse des Gastéropodes Pulmonés correspond à une spécialisation destinée à assurer la survie prolongée du sperme dans les voies femelles dans l'attente de la fécondation.

RESUME

Au cours de certaines phases de l'activité cellulaire, les mitochondries subissent des remaniements plus ou moins importants des structures originelles. Il en est fréquemment ainsi au cours de la spermatogénèse lors de l'édification de la pièce intermédiaire.

Chez les Gastéropodes Pulmonés notamment, le dérivé mitochondrial ainsi formé présente une structure aberrante dont la nature mitochondriale ne peut-être reconnue que si l'on suit son apparition et son évolution au cours de la spermatogénèse.

L'application à l'échelle des ultrastructures des techniques de la cytochimie et de la cytoenzymologie montre :

1) d'une part que les remaniements du chondriome au cours de la spermatogénèse des Gastéropodes Pulmonés aboutissent à *ségréger* puis à *compartimenter les enzymes de la chaîne respiratoire*, qui, dans les mitochondries banales, font partie intégrante de la membrane des crêtes. Dans le dérivé mitochondrial du spermatozoïde en effet, la surface de la membrane interne est réduite et les transporteurs d'électrons se localisent dans le compartiment intermembranaire dilaté, dont le contenu ou pseudomatrice cristallise. La succinodéshydrogénase et la NADH_2 déshydrogénase, par contre, sont dans le compartiment matriciel avec les autres déshydrogénases du cycle tricarboxylique ;

2) d'autre part qu'un compartiment non mitochondrial persiste, invaginé dans le dérivé mitochondrial et qu'il s'y élabore un abondant *stock de glycogène* durant la maturation du gamète. A ce glycogène sont associées les enzymes de son catabolisme.

Ainsi, la pièce intermédiaire des Gastéropodes Pulmonés réunit en un seul complexe, autour des structures contractiles de l'axonème, le substrat énergétique et le générateur d'ATP. Il y a là une disposition fonctionnelle semblable à celle du muscle, qui montre le haut degré de spécialisation de cette pièce intermédiaire.

Le nouvel arrangement des enzymes respiratoires et le faible développement de la membrane interne conduisent à se demander par quels mécanismes s'effectue la phosphorylation oxydative et qu'elle est son efficacité.

BIBLIOGRAPHIE

- AFZELIUS, B.A. 1970. Thoughts on comparative spermatology
Ist. International Symposium on comparative Spermatology.
Baccetti ed. Academia Nazionale dei Lincei, Roma. 565-573.
- ANCEL, P. 1903. Histogenèse et structure de la glande
hermaphrodite d'*Helix pomatia* L. *Arch. Biol.*, 19, 389-652.
- ANDERSON, W.A. 1968. Cytochemistry of sea urchin gametes.
I. Intramitochondrial localization of glycogen, glucose-6-
phosphatase, and adenosine triphosphatase activity in
Spermatozoa of *Paracentrotus lividus*. *J. Ultrastruct. Res.*,
24, 398-411.
- ANDERSON, W.A. et ELLIS, R.A. 1967. Cytodifferentiation of
the crayfish spermatozoon : acrosome formation, transformation
of mitochondria and development of microtubules. *Z. Zellforsch.*,
77, 80-94.
- ANDERSON, W.A., WEISSMAN, A. et ELLIS, R.A. 1967. Cytodiffe-
rentiation during spermiogenesis in *Lumbricus terrestris*. *J.*
Cell Biol., 32, 11-26.
- ANDERSON, W.A. et PERSONNE, P. 1967. The fine structure of the
neck region of spermatozoa in *Helix aspersa*. *J. Microsc.*, 6,
1033-1042.
- ANDERSON, W.A., PERSONNE, P. et ANDRÉ, J. 1968. Chemical
compartmentalization in *Helix* spermatozoa. *J. Microsc.*, 7,
367-390.
- ANDERSON, W.A. et PERSONNE, P. 1969. The cytochemical locali-
zation of sorbitol deshydrogenase activity in spermatozoa of
Helix aspersa. *J. Microsc.*, 8, 97-102.
- ANDERSON, W.A. et PERSONNE, P. 1970. The localization of
glycogen in the spermatozoa of various invertebrate and
vertebrate species. *J. Cell Biol.*, 44, 29-51.
- ANDRÉ, J. 1956. L'ultrastructure des mitochondries des
spermatocytes de l'escargot *Helix pomatia* L. *C.R. Acad. Sci.*,
242, 2048-2051.
- ANDRÉ, J. 1959. Sur l'existence d'un état paracristallin du
matériel chondriosomique de certains spermatozoïdes. *C. R. Acad.*
Sci., 249, 1264-66.

- ANDRÉ, J. 1962. Contribution à la connaissance du chondriome. Etude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogenèse. *J. Ultrastruct. Res.*, 3, 1-185.
- ANDRÉ, J. 1963. Some aspects of specialization in sperm. In. *General Physiology of cell specialization*. D. Mazia et E. Tyler ed. Mc Graw-Hill Book Co, New-York, 91-115.
- ANDRÉ, J. 1965. Quelques données récentes sur la structure et la physiologie des mitochondries : glycogène, particules élémentaires, acides nucléiques. *Arch. Biol.*, 76, 277-304.
- BACCETTI, B., DALLAI, R. et ROSATI, F. 1969. The spermatozoon of arthropoda. III The lowest holometabolic insects. *J. Microsc.* 8, 233-248.
- BACCETTI, B. 1970. Ist. International Symposium on Comparative Spermatology. Academia Nazionale dei Lincei, Roma.
- BARNETT, R.J. 1959. The demonstration with the electron microscope of the end-products of histochemical reactions in relation to the fine structure. *Exptl. Cell. Res.*, 7, 65-89.
- BARNETT, R.J. 1960. Combination of histochemistry and cytochemistry with electron microscopy for the demonstration of the sites of succinic dehydrogenase activity. In *fourth international Congress on Electron Microscopy*, 2, 91-100.
- BEAMS, H.W. et TAHMISIAN, T.N. 1954. Structure of the mitochondria in the male germ cells of *Helix* as revealed by the electron microscope. *Expt. Cell. Res.*, 6, 87-93.
- BEARD, M.E. et NOVIKOFF, A.B. 1969. Distribution of peroxisomes (microbodies) in the nephron of the rat. A cytochemical study *J. Cell. Biol.*, 42, 501-518.
- BEAULATON, J. 1964. Sur l'accumulation intramitochondriale de glycogène dans la glande prothoracique du ver à soie du chêne *Antherea pernyi* (Guer.) pendant les quatrième et cinquième stades larvaires. *C. R. Acad. Sci. Paris* 258, 4139.
- BERTHOLD, C.H. 1966. Ultrastructural appearance of glycogen in the B-Neurons of the Lumbar Spinal ganglia of the froy. *J. Ultrastruct. Res.*, 14, 254-267.

- BIGLIARDI, E., BACCETTI, B., BURRINI, G. et PALLINI, V. 1970. The spermatozoon of Arthropoda. XII The distribution of some enzymes in the insect sperm tail. *Ist. International Symposium on Comparative Spermatology*. Baccetti ed. *Accademia Nazionale dei Lincei, Roma*. 451-463.
- BISHOP, D.W. 1967. Significance of testicular sorbitol deshydrogenase (SDH). *J. Gen. Physiol.*, 50, 2047.
- BRANDES, O., ZETTERQUIST, W. et STELDEN, H. 1956. Histochemical technique for electron microscopy : alkaline phosphatase. *Nature*, 177, 382-383.
- BURSTONE, M.S. 1959. New histochemical technique for the demonstration of tissue oxidase (cytochrome-oxidase). *J. Histochem. Cytochem.*, 7, 112-122.
- CARASSO, N. et FAVARD, P. 1958. L'origine des plaquettes vitellines de l'oeuf de Planorbe. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 246, 1594-1597.
- CHANCE, B., PARSONS, F. et WILLIAMS, R.G. 1964. Cytochrome content of mitochondria stripped of inner membrane structure *Science*, 143, 136-139.
- CHIUQUOINE, A.D. 1953. The distribution of glucose-6-phosphatase in the liver and kidney of the mouse. *J. Histochem. Cytochem.*, 1, 429-435.
- CONKLIN, E.G. 1924. Cellular differentiation in E.V. Cowdry (ed.) : *General cytology*, University of Chicago Press, Chicago, 537-608.
- COWDRY, E.V. 1924. General cytology. The University of Chicago Press, Chicago.
- EDWARDS, R.G. et VALENTINE, R.C. 1963. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase in intact rabbit spermatozoa. *Exptl. Cell. Res.*, 31, 508-516.
- FAHIMI, H.D. et AMARASINGHAM, C.R. 1964. Cytochemical localization of lactic dehydrogenase. *J. Cell. Biol.*, 22, 29-48.
- FAHIMI, H.D. et KARNOVSKY, M.J. 1966. Cytochemical localization of two glycolytic dehydrogenases in white skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, 29, 113-128.
- FAIN-MAUREL, M.A. 1966. Localisation intramitochondriale et intracisternale de glycogène monoparticulaire. *C. R. Acad. Sci.*, 263, 1107-1110.

- FARBER, E., STERNBERG, W.H. et DUNLAP, C.E. 1956. Histochemical localization of specific oxidative enzymes. I Tetrazolium stains for Diphosphopyridine diaphorase. *J. Histochem. cytochem.*, 4, 254-265.
- FAVARD, P. et ANDRÉ, J. 1970. The mitochondria of spermatozoa. *Ist. International Symposium on Comparative Spermatology. Baccetti ed. Academia Nazionale dei Lincei, Roma.* 415-429.
- FAVARD, P. et CARASSO, N. 1958. Origine et ultrastructure des plaquettes vitellines de la Planorbe. *Arch. Anat. Micr. Morph. Exp.*, 47, 211-234.
- FAWCETT, D.W. 1958. The structure of the mammalian spermatozoon. *Intern. Rev. Cytol.*, 7, 195-234.
- FAWCETT, D.N. 1962. Sperm tail structure in relation to the mechanism of movement. In *Spermatozoan motility*. D.W. Bishop ed. American Association for the Advancement of Science Washington, 147-169.
- FERNANDEZ-MORAN, H. 1962. Molecular organization of cell membranes. *Circulation*, 26, 1039.
- FLATMARK, T. 1965. Studies on peroxidase effect of cytochrome c. IV The influence of pH and certain anions on the over-all reaction. *Acta chem. Scand.*, 19, 2059-2064.
- FLORKIN, M. et STOTZ, E.H. 1964. *Compréhensive Biochemistry* Vol. 13.
- FRANZEN, A. 1955. Comparative morphological investigation into the spermiogenesis among *Mollusca*. *Zool. Bidrag. fran Uppsala*, 30, 399-456.
- FRANZEN, A. 1956. On spermiogenesis, morphology of the spermatozoon and biology of fertilization among invertebrates. *Zool. Bidrag fran Uppsala*, 31, 355-482.
- GARREAU de LOUBRESSE, N. 1967. Apparition de structures cristallines au cours de la spermiogenèse de *Tanymastix lacunoe* G. (crustacé entomostracé). *C.R. Acad. Sci.*, 264, 2325-2328.
- GATENBY, J.B. 1917. The cytoplasmic inclusions of the germ-cells II. *Helix aspersa*. *Quart. J. Microsc. Sci.*, N.S. 62, 555-611.
- GATENBY, J.B. 1918. The cytoplasmic inclusions of germ cells. III. The spermatogenesis of some other pulmonates. *Quart. J. Microsc. Sci.*, 63, 197-258.

GHARAGOZLOU, I.D. 1969. Particularités morphologiques des mitochondries de la cellule adipeuse de *Periplaneta americana* (Blattidae). *J. Microsc.*, 8, 189-196.

GOMORI, G. 1939. Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 42, 23-26.

GOMORI, G. 1941. Distribution of acid phosphatase in the tissues under normed and under pathological conditions. *Arch. Path.*, 32, 188-199.

GONATAS, N.K., EVANGELISTA, I. et MARTIN, J. 1967. A generalized disorder of nervous system, skeletal muscle and heart resembling Refsum's disease and hurley's syndrome. II. Ultrastructure. *Ann. J. Med.*, 42, 169-178.

GORDON, M. et BARNETT, R.J. 1967. Fine structural cytochemical localization of phosphatase activities of rat and guinea pig. *Exp. Cell Res.*, 48, 395-411.

GRAHAM, R.C. et KARNOVSKY, M.T. 1966. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney. Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 14, 291-302

GRASSÉ, P.P., CARASSO, N. et FAVARD, P. 1956. Les ultrastructures cellulaires au cours de la spermiogenèse de l'Escargot (*Helix pomatia* L.) évolution des chromosomes, du chondriome, de l'appareil de Golgi, ect. *Ann. Sci. Nat. Zool. 11e série*, 338-380.

GREEN, D.E., BLAIR, P.V. et ODA, T. 1963. Isolation and characterization of the unit of electron transfer in heart mitochondria. *Science*, 140, 382.

GREEN, D.E., MU, S. et KCHOUT, P.M. 1955. Studies on the terminal electron transport system. I. Succinic deshydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 217, 551-567.

GRUNNER, J.E. 1963. Sur quelques anomalies mitochondriales observées au cours d'affections musculaires variées. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 157, 181-183.

GUHA, S. et WEGMANN, R. 1959. Etude sur l'activité phosphorylasique I. Une nouvelle méthode de mise en évidence de la phosphorylase. *Annales d'Histoch.*, 4, 103-114.

GUSTAFSSON, R., TATA, J.R., LINDBERG, O. et ERNSTER, L. 1965. The relationship between the structure and activity of rat skeletal muscle mitochondria after thyroidectomy and thyroid hormone treatment. *J. Cell Biol.*, 26, 555-578.

HANKER, J.S., SEAMAN, L.P., WEISS, H.P., UENO, H., and SELIGMAN, A.M. 1964. Osmiophilic reagent : new cytochemical principle for light and electron microscopy. *Science*, 140, 1039-1043.

HAUST, M.D. 1968. Crystalloid structures of hepatic mitochondria in children with heparitin sulfate mucopolysaccharidosis (Sandfilippo type) *Exp. mol. Pathol.*, 8, 213.

HORI, S.H. 1964. Cytological phosphorylase locations in rat liver and muscle as shown by a lead precipitation method. *Stain technology*, 39, 275-278.

HORSTMANN, E. 1968. Die spermatozoen von *Geophilus linearis* Koch (Chilopoda). *Z. Zellforsch.*, 89, 410-429.

IDELMAN, S. 1963. Action du methanol-chloroforme sur les liposomes des cellules cortico-surrénales. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 257, 297-298.

IDELMAN, S. 1967. Données récentes sur l'infrastructure du spermatozoïde. *Ann. Biol.*, VI, 113-190.

ISHIKAWA, T. et PEY, Y.F. 1965. Intramitochondrial glycogen particles in rat retinol receptor cells. *J. Cell. Biochem.*, 25, 402-407.

JACOBS, E.E., ANDREWS, E.C., CUNNINGHAM, W. et CRANE, F.L. 1966. Membraneous cytochrome oxidase. Purification, properties and reaction characteristics. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 25, 87-95.

JACOBS, E.E., KIRKPATRICK, F.H., ANDREWS, E.C., CUNNINGHAM, W. et CRANE, F.L. . Lipid-free soluble cytochrome oxidase. Purification, properties and reaction characteristics. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 25, 96-104.

KAGAWA, Y. et RACKER, E. 1966. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. Correlation of morphology and function in submitochondrial particles. *J. Biol. Chem.*, 241, 2475-2482.

KALINA, M., WEAVERS, B. et PEARSE, A.G.E. 1969. Fine structural localization of succinoxidase complexe on the mitochondrial cristal. *Nature*, 221, 479-480.

- KALINA, M., WEAVERS, B. et PEARSE, A.G.E. 1971. Ultrastructural localization of succinate dehydrogenase in mouse liver mitochondria a cytochemical study. *J. Histochem. Cytochem.*, 19, 124-130.
- KARASAKI, S. 1963. Studies on amphibian yolk. *J. Ultrastruc. Res.*, 9, 225-247.
- KARNOVSKY, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 27, 137 A.
- KARNOVSKY, M.J. et RICE, F. 1969. Exogenous cytochrome c as an ultrastructural tracer. *J. Histochem. Cytochem.*, 17, 751-753.
- KAYE, J.S. 1958. Changes in the fine structure of mitochondria during spermatogenesis. *J. Morphol.*, 102, 347-400.
- KEILIG, I. 1944. Über spezifitätsbreite und Grundlagen der Markscheidenfärbungen. *Virchows Arch.*, 312, 405-420.
- KESSEL, R.G. 1966. The association between microtubules and nuclei during spermiogenesis in the Dragonfly. *J. Ultrastruc. Res.*, 16, 293-304.
- KINTZ, R. 1966. Dystrophische Veränderungen in äußeren Augenmuskeln und Schultermuskeln bei der progressiven graefeschen ophthalmoplegie. *Progressive muskeldystrophie myotonie myastenie E. Kuhn. Springer-Verlag.* 109-114.
- LEDUC, E.H., MARINOZZI, V. et BERNHARD, W. 1963. The use of watersoluble glycolmethacrylate in ultrastructural cytochemistry. *J. Roy. Microsc. Soc.*, 81, 119-130.
- LEHNINGER, A.L. 1964. The mitochondrion. *Benjamin W.A. Inc. New-York.*
- LENTZ, T.L. 1966. Intramitochondrial glycogen granules in digestive cells of hydra. *J. Cell. Biol.* 29, 162-167.
- LUFT, R., IKKOS, D., PALMIERI, G., ERNSTER, L. et AFZELIUS, B. 1962. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control : a correlated clinical, biochemical and morphological study. *J. Clin. Invest.*, 41, 1776-1804.
- MANN, T. 1964. Biochemistry of semen and of the male reproductive tract. *Methuen, London.*

- MASSOVER, W.H. 1970. Formation and fate of intramitochondrial yolk-crystals and hexagonal crystalloids in bullfrog oocytes. *VIIe Congrès International de Microscopie Electronique*. P. FAVARD ed., III, 139-140.
- MINIO, F., LOMBARDI, L. et GAUTIER, A. 1966. Mise en évidence et ultrastructure du glycogène hépatique. Influence des techniques de préparation. *J. Ultrastruc. Res.*, 16, 339-358.
- MONNERON, A. et BERNHARD, W. 1966. Action de certaines enzymes sur des tissus inclus en epon. *J. Microsc.*, 5, 697-714.
- MOOG, F. 1943. Cytochrome oxidase in early chick embryos. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 22, 223-231.
- MUGNAINI, E. 1964. Helical filaments in astrocytic mitochondria of the corpus striatum in the rat. *J. Cell Biol.*, 23, 173-182.
- NAPOLITANO, L. et FAWCETT, D. 1958. The fine structure of brown adipose tissue in the newborn mouse and Rat. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4, 685-692.
- NELSON, L. 1958. Cytochemical studies with the electron microscope. I. Adenosinetriphosphatase in rat spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta*, 27, 634-641.
- NELSON, L. 1967. Sperm motility. In. *Fertilization*. C.B. Metz et A. Monsoy Ed., 1, Acad. Press N.Y., 27-85.
- NELSON, L. 1962. Cytochemical aspect of spermatozoan motility. In. *Spermatozoan Motility*. D.N. Bishop ed. 171-187, Ann. Assoc. Advance. Sci., Washington, D.C.
- NORDLIE, R.C. 1968. The role phosphohydrolase and phosphotransferase activities of glucose-6-phosphatase in glycogen metabolism. *Proceeding of the Fourth. meeting of the Federation of European Biochemical Societies.*, Whelan ed., Universitet forlaget oslo et Academic Press London-New-York, 153-168.
- NORRIS, F.H. et PANNER, B.J. 1966. Hypothyroid myopathy. *Arch. Neurol.*, 14, 574-589.
- NOVIKOFF, A.B. 1963. Electron transport enzymes biochemical and tetrazolium staining studies. *First International Congress of Histochemistry and Cytochemistry*, Pergamon Press, 465-481.
- NOVIKOFF, A.B. et GOLDFISCHER, S. 1968. Visualization of microbodies for light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 16, 507.

- ODA, T. et SEKI, S. 1966. Molecular organization of the energy transducing system in the mitochondrial membrane. *Sixth. International congress for electron microscopy, II*, 369-370.
- OGAWA, K. et BARNETT, R. 1965. Electron cytochemical studies of succinic dehydrogenase and dihydronicotinamide-adenine dinucleotide diaphorase activities. *J. Ultrastruc. Res.*, 12, 488-508.
- OGAWA, K. et SAITO, Y. 1963. Electron histochemistry of dihydronicotinamide-adenine dinucleotide (NADH_2) diaphorase using tetrazolium salts as H acceptors. *J. Electron. Microsc.* Tokyo, 12, 67-71.
- OGAWA, K., SAITO, T. et MAYAHARA, H. 1968. The site of ferricyanide reduction by reductases within mitochondria as studied by electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 16, 49-57.
- PADYKULA, H. et GAUTHIER, G.F. 1963. Cytochemical studies of adenosine triphosphatases in skeletal muscle fibers. *J. Cell Biol.*, 18, 87-107.
- PADYKULA, H. et HERMAN, E. 1955. Specificity of histochemical method for adenosine triphosphatases in skeletal muscle fibers. *J. Cell Biol.*, 18, 87-107.
- PALADE, G.E. 1952. The fine structure of mitochondria. *Anat. Record.*, 114, 427-452.
- PEROTTI, M.E. 1969. Ultrastructure of the mature sperm of *Drosophila melanogaster* Meig. *J. Submicr. cytol.*, 1, 171-196.
- PERSONNE, P. 1965. Etude cytochimique du dérivé mitochondrial du spermatozoïde de la testacelle recherche des protéines et des lipides. *J. Microsc.*, 4, 627-642.
- PERSONNE, P. 1968. Existence de glycogène dans l'axonème de spermatozoïde *J. Microsc.*, 7, 50a.
- PERSONNE, P. Existence de glycogène dans l'axonème de certains flagelles (en préparation)
- PERSONNE, P. et ANDERSON, W.A. 1969. Compartimentage des activités enzymatiques dans le spermatozoïde de certains mollusques gastéropodes. I. Localisation des deshydrogenases. *J. Cell Sci.*, 4, 693-707.
- PERSONNE, P. and ANDERSON, W.A. 1970. Localisation mitochondrial d'enzymes liées au métabolisme du glycogène dans le spermatozoïde de l'Escargot. *J. Cell Biol.*, 44, 20-28.

- PERSONNE, P. et ANDERSON, W.A. 1970. Etude comparée des évolutions mitochondriales au cours de la spermatogenèse chez quelques Gastéropodes. *Symposium on Comparative Spermatology, Rome-Sienne 1969, Baccetti ed. 1970,*
- PERSONNE, P. et ANDRÉ, J. 1964. Existence de glycogène mitochondrial dans le spermatozoïde de la testacelle. *J. Microsc.*, 3, 643-650.
- PHILLIPS, D.M. 1966. Fine structure of *Sciara coprophila* sperm. *J. Cell Biol.*, 30, 499-517.
- PHILLIPS, D.M. 1970. Insect sperm : their structure and morphogenesis. *J. Cell Biol.*, 44, 243-277.
- PICHERAL, B. 1968. Les tissus élaborateurs d'hormones stéroïdes chez les Amphibiens urodèles. II. Aspects ultrastructuraux de la glande interrénale de *Salamandra salamandra* (L.). Etude particulière du glycogène. *J. Microsc.*, 7, 907-926.
- PORTA, E.A., HARTROFT, W.S. et de la IGLESIA, F.A. 1965. Hepatic changes associated with chronic alcoholism in rats. *Lab. Invest.*, 14, 1437.
- PREZBINDOWSKI, K.S., RUZIEKA, F.J., SUN, F.F. et CRANE, F.L. 1969. Membrane structure : binary membranes of mitochondria cristae. *Esp. Cell Res.*, 57, 385-391.
- PRICE, H.M., GORDON, G.B., MUNSAT, T.L. et PEARSON, C.M. 1967. Myopathy with atypical mitochondria in type I skeletal muscle fibers. A histochemical and ultrastructural study. *J. Neuropath.*, 26, 475-497.
- PULLMAN, M., PENEFSKY, H.S., DATTA, A. et RACKER, E. 1960. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative triphosphatase. I. Purification and properties of soluble, dinitrophenol stimulated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 235, 3322-3329.
- RACKER, E., TYLER, D.D., ESTABROOK, R.W., CONOVER, T.E., PARSONS, D.F. et CHANCE, B. 1965. Correlations between Electron Transport Activity, ATP ase, and morphology of Submitochondrial particles. in "oxidases and related redox systems" II, 1077, King T.E., Mason H.S. et Marison M. ed., John Wiley et Sons, Inc., New York.

- RETZIUS, G. 1904. Zur Kenntnis der Spermien der Evertebraten. *Biol. Untersuch. N.F.*, 11, n° 1, 1-32.
1905. Zur Kenntnis der Spermien der Evertebraten. II. Die Spermien der Leptokardier, Teleostier und Ganoider. *Ibid.*, 12, n° 9 and 10, 79-115.
- 1906a. Die Spermien der Gastropoden. *Ibid.*, 13, n° 1, 1-36
- 1906b. Die Spermien der Enteropneusten und der Nemertinen. Die Spermien der Turbellarien. Die Spermien der Bryozoen. *Ibid.*, n° 2, 3 and 4, 37-48.
- 1906c. Die Spermien der Amphibien. *Ibid.*, n° 5, 49-70.
- 1909a. Die Spermien der Crustaceen. *Ibid.*, 14, n° 1, 1-54.
- 1909b. Spermien der Insekten, *Aurelia aurita* (L.) Nereiden, Cestoden, Trematoden, Chaetognathen, Bryozoen u. *Nassa reticula* (L.) *Ibid.*, 14, n° 2-8, 54-78.
- 1909c. Zur Kenntnis der Spermien der Elasmobranchier. *Ibid.*, n° 9, 79-88.
1910. Zur Kenntnis der Spermien der Echinodermen. Weitere Beiträge zur Kenntnis der Spermien mit besonderer Berücksichtigung der Kernsubstanz. *Ibid.*, 15, n° 2, 3, 54-82.
1912. Weitere Beiträge zur Kenntnis der Spermien der Gastropoden und Vogel. *Ibid.*, 17, n° 6, 95-99.
- RHODIN, J. 1954. Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of mouse kidney. *Thesis, Karolinska Institutet, Stockholm*, 1-76.
- ROBERTSON, J.D., BODENHEIMER, T.S. et STAGE, D.E. 1963. The ultrastructure of mauthner cell synapses and nodes in goldfish brains. *J. Cell Biol.*, 19, 159-199.
- ROELS, F. 1970. Localisation ultrastructurale du cytochrome c dans l'ovocyte d'*Artemia salina* par la 3,3' diaminobenzidine a pH 9. *C.R. Acad. Sci.*, 270, 2322-2324.
- SABATINI, D.D., BENOCK K.G. et BARNETT, R.J. 1964. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.*, 17, 19-58.
- SABATINI, D.D., MILLER, F. et BARNETT, D.R.J. 1964. Aldehyde fixation for morphological and enzyme histochemical studies with the electron microscope. *J. Histochem. Cytochem.*, 12, 57-71.

- SEDAR, A.W. et ROSA, C.G. et TSOU, K.C. 1962. Tetranitro-blue tetrazolium and the electron histochemistry of succinic dehydrogenase. *J. Histochem. Cytochem.*, 10, 506-508.
- SELIGMAN, A.M., HANTER, J.S., WASSERKRUG, H., DMOCHOWSKI, H. et KATZOFF, L. 1965. Histochemical demonstration of some oxidized macromolecules with thiocarbohydrazide (T.C.H.) or thiosemicarbazide (T.S.C.) and osmium tetroxide. *J. Histochem. Cytochem.*, 13, 629-639.
- SELIGMAN, A.M., UENO, H., MORIZONO, Y., WASSERKRUG, H.L., KATZOFF, L. et HANKER, J.B. 1967. Electron microscopic demonstration of dehydrogenase activity with a new osmiophilic ditetrazolium salt (TC-NBT). *J. Histochem. Cytochem.*, 15, 1-13.
- SELIGMAN, A.M., PLAPINGER, R.E., WASSERKRUG, H.L., CHANDICHARAN, Deb et HANKER, J. 1967. Ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity by the nadi reaction with osmiophilic reagents. *J. Cell Biol.*, 34, 787-800.
- SELIGMAN, A.M., KARNOVSKY, M.J., WASSERKRUG, L. et HANKER, J.S. 1968. Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymeric osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). *J. Cell Biol.*, 38, 1-14.
- SHELDON, H., ZETTERGWIST W. et BRANDES, D. 1955. Histochemical reactions for electron microscopy : acid phosphatase. *Exp. Cell Res.*, 9, 592-596.
- SJÖSTRAND, J.L. 1953. Ultrastructure of rod-shaped mitochondria. *Nature*, 171, 30-31.
- SJÖSTRAND, F.S. et RHODIN, J. 1953. The ultrastructure of the proximal convoluted tubules of the mouse kidney as revealed by high resolution electron microscopy. *Exp. Cell Res.*, 4, 426-456.
- SKY, G.M., GONATAS, N.K. et PEREZ, M. 1966. Two childhood myopathies with abnormal mitochondria. I. megaconial myopathy. II. Pleoconial myopathy. *Brain*, 89, 133.
- SMITH, D.S. 1968. Insect cells their structure and function. *Oliver and Boyd. Edinburgh.*
- SOTTOCASA, G.L., KUYLENSTIERERA, B., ERNSTER, L. et BERGSTRAND, A. 1967. An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biochemical and morphological study. *J. Cell Biol.*, 32, 415-438.

- STASNY, J. T. et CRANE, F.L. 1964. The effect of sonic oscillation on the structure and function of beef heart mitochondria. *J. Cell Biol.*, 22, 49-62.
- STERNLIEB, I. et BERGER, J.E. 1969. Optical diffraction studies of crystalline structures in electron micrographs. II Crystalline inclusions in mitochondria of human hepatocytes. *J. Cell Biol.*, 43, 448-455.
- SUZUKI, T. et MOSTOFI, F.K. 1967. Intramitochondrial filamentous bodies in the thick limb of henle of the rat kidney. *J. Cell Biol.*, 33, 605-624.
- SVOBODA, D.J. et HIGGINSON, J. 1964. Ultrastructural changes produced by protein and related deficiencies in the rat liver. *Ann. J. Pathol.*, 45, 353-379.
- SWANSON, M.A. 1948. Studies on the structure of polysaccharides IV Relation of the iodine color to the structure. *J. Biol. Chem.*, 172, 825-829.
- TAHMISIAN, T.N. 1964. On orderly domains of particles associated with cytomembranes during spermatogenesis in *Helix aspersa*. *Z. Zellforsch.*, 64, 25-31.
- TAKEUCHI, T. 1958. Histochemical demonstration of branching enzyme (Amylo-1,4 1,6-transglucosidase) in animal tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 6, 208.
- TAKEUCHI, T. et KURIAKI, H. 1955. Histochemical demonstration of phosphorylase in animal tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 3, 153-160.
- TANDLER, B. et SHIPKEY, F.H. 1964. Ultrastructure of Warthin's Tumor. I. Mitochondria. *J. Ultras. Res.*, 11, 292-305.
- TAYLOR, J.W. 1900. a monograph of the Land and freshwater mollusca of the British Isles. *Taylor Bros., Leeds*, 1-454.
- THIÉRY, J.P. 1967. Mise en évidence de polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microsc.*, 6, 987-1018.
- TRUMP, B.F. et Coll 1964. Effects of freezing and thawing on the ultrastructure of mouse hepatic parenchymal cells. *Laboratory Invest.*, 13, 967-1002.
- TSOU, K.C., GOODWIN, C.W., SEAMOND, B. et LYNN, D. 1968. Intracrystal localization of succinic dehydrogenase activity with a new osmium-containing tetra-tetrazolium salt. *J. Histochem. Cytochem.*, 16, 487-489.

- TZAGOLOFF, A., BYINGTON, K.H. et Mac LENNAN, D.H. 1968. Studies on the mitochondrial adenosine triphosphatase system. The isolation and characterization of an oligomycin-sensitive adenosine triphosphatase from bovine reart mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 243, 2405-2412.
- VENABLE, J.H. et COGGESHALL, R. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 25, 407-408.
- VOELZ, H. et DWORKIN, M. 1962. Fine structure of myxococcus xanthus during morphogenesis. *J. Bact.*, 84, 943-952,
- WACHSTEIN, M. et MEISEL, E. 1957. Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH with special reference to the demonstration of libe canaliculi. *Ann. J. Clin. Path.*, 27, 13-23.
- WANSON, J.C. et DROCHMANS, P. 1967. Detection of phosphorylase with the electron microscope. *Proceedings of the fourth meeting of the Federation of European Biochemical Societies.*, Whelan ed., Universitetforlaget Oslo et Academic Press London-New-York., 168-177.
- WARD, R.T. 1962. The origin of protein and fatty yoek in *Rana pipiens*. II Electron microscopical and cytochemical observations of young and mature oocytes. *J. Cell Biol.*, 14, 309-341.
- WATRACH, A.M. 1964. Degeneration of mitochondria in lead poisoning. *J. Ultrastruc. Res.*, 10, 177-181.
- YAMAMOTO, T. et Coll. 1969. Intramitochondrial inclusions in various cells a snake (*Elaphoe quadrivirgata*). *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 99, 252-262.

PLANCHES

SOMMAIRE

1. MORPHOLOGIE

- PLANCHE I : spermatogonies, spermatocytes, spermatide Stade 1
PLANCHE II : spermatides stade 1 et 2
PLANCHE III : spermatides stade 2
PLANCHE IV : spermatide *Helix pomatia* stade 2
spermatide *Limnea stagnalis* stade 1
PLANCHE V : spermatide stade 3, cytoplasme résiduel
PLANCHE VI : spermatide stade 3, pièce intermédiaire
PLANCHE VII : jeune spermatozoïde, pièce intermédiaire
PLANCHE VIII : jeune spermatozoïde, cytoplasme résiduel
PLANCHE XVII : spermatozoïde en cours de maturation, région
du "col"
PLANCHE XVIII : spermatozoïde en cours de maturation, région du
"col" et coupe longitudinale du dérivé mitochondrial.

2. CYTOCHIMIE

- PLANCHE IX : action des protéases
PLANCHE X : action des protéases
PLANCHE XI : activité DAB oxydasique
PLANCHE XII : activités SDH tétrazolium réductase et NADH_2
tétrazolium réductase
PLANCHE XIII : sorbitol déshydrogénase
PLANCHE XIV : le glycogène du canal paraflagellaire
PLANCHE XV : mise en évidence de la glycéraldéhyde 3-phosphate
déshydrogénase
PLANCHE XVI : mise en évidence de la Glucose 6-phosphatase

TABEAU DES ABREVIATIONS

A : axonème	Me : membrane mitochondriale externe
Bf : baguette fibrillaire	Mi : membrane mitochondriale interne
Cr : cristal	Mp : membrane plasmique
E : ergastoplasme	Mt : microtubules
F : flagelle	N : noyau
Ma : matrice	P : hélice principale
	Pm : pseudomatrice

PLANCHE I

Fig. 1 Spermatogonie d'*Hélix aspersa*. Les mitochondries ovoïdes et peu nombreuses ont des crêtes longitudinales. X 12.000

Fig. 2 Spermatocyte d'*Hélix aspersa*. Le cytoplasme est très riche en ribosomes. La population mitochondriale peu abondante devient hétérogène. Si la majeure partie des mitochondries demeure semblable à celles des spermatogonies, un certain nombre sont allongées et d'autres présentent un espace intracristal dilaté renfermant de fins filaments (flèche). X 12.000

Fig. 3 Jeune spermatide d'*Hélix aspersa*. La majeure partie des mitochondries est groupée à un pôle de la cellule. Les mitochondries, à crête centrale dilatée remplie de filaments, deviennent plus nombreuses (flèches) X 30.000

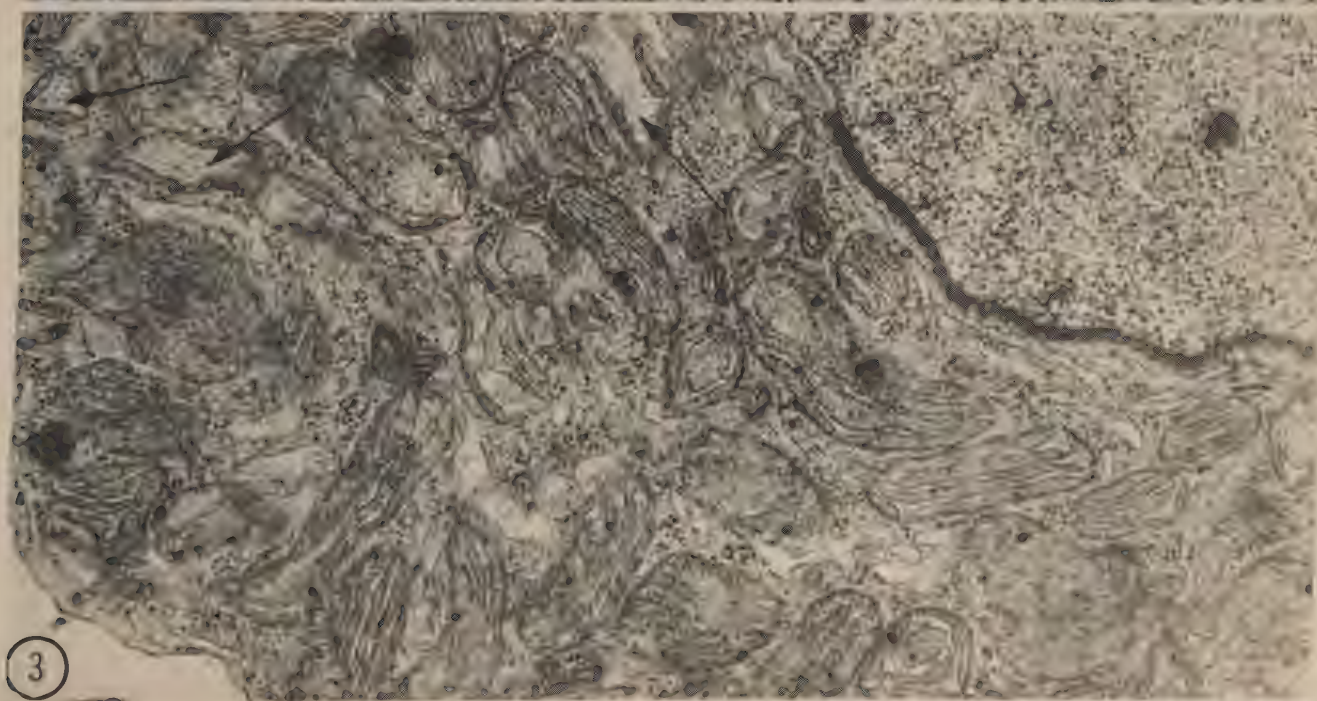
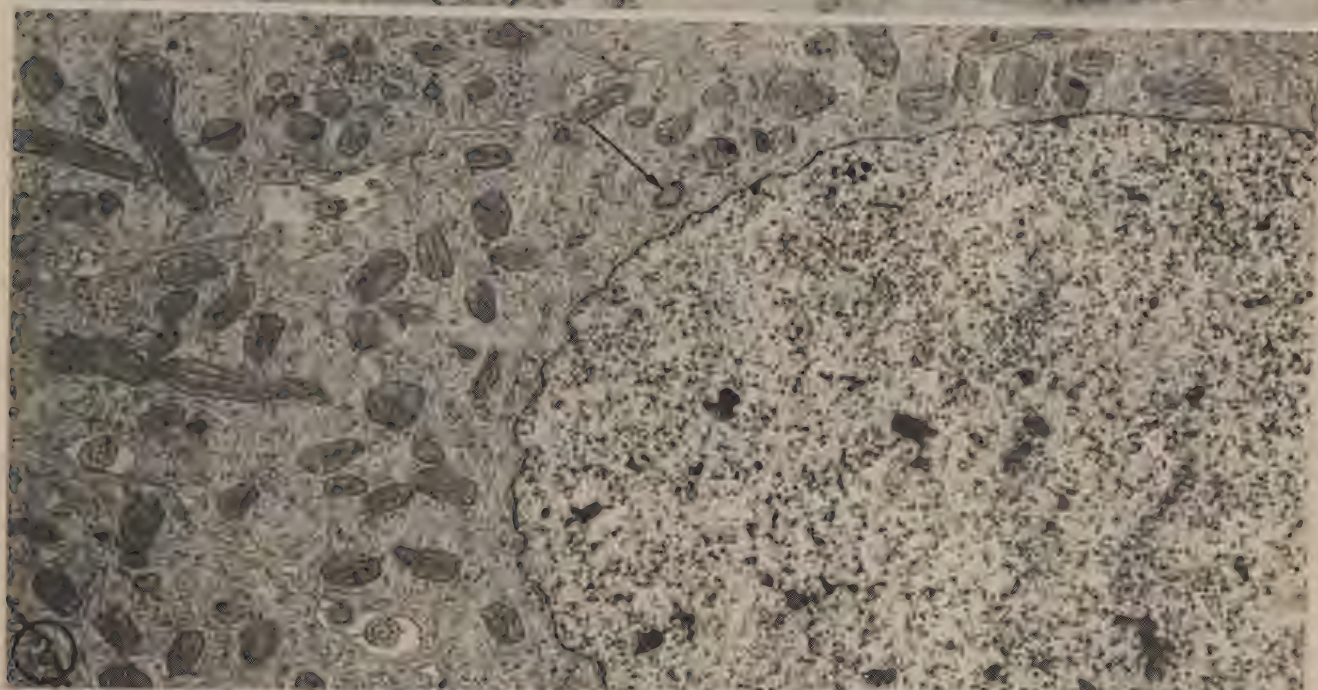
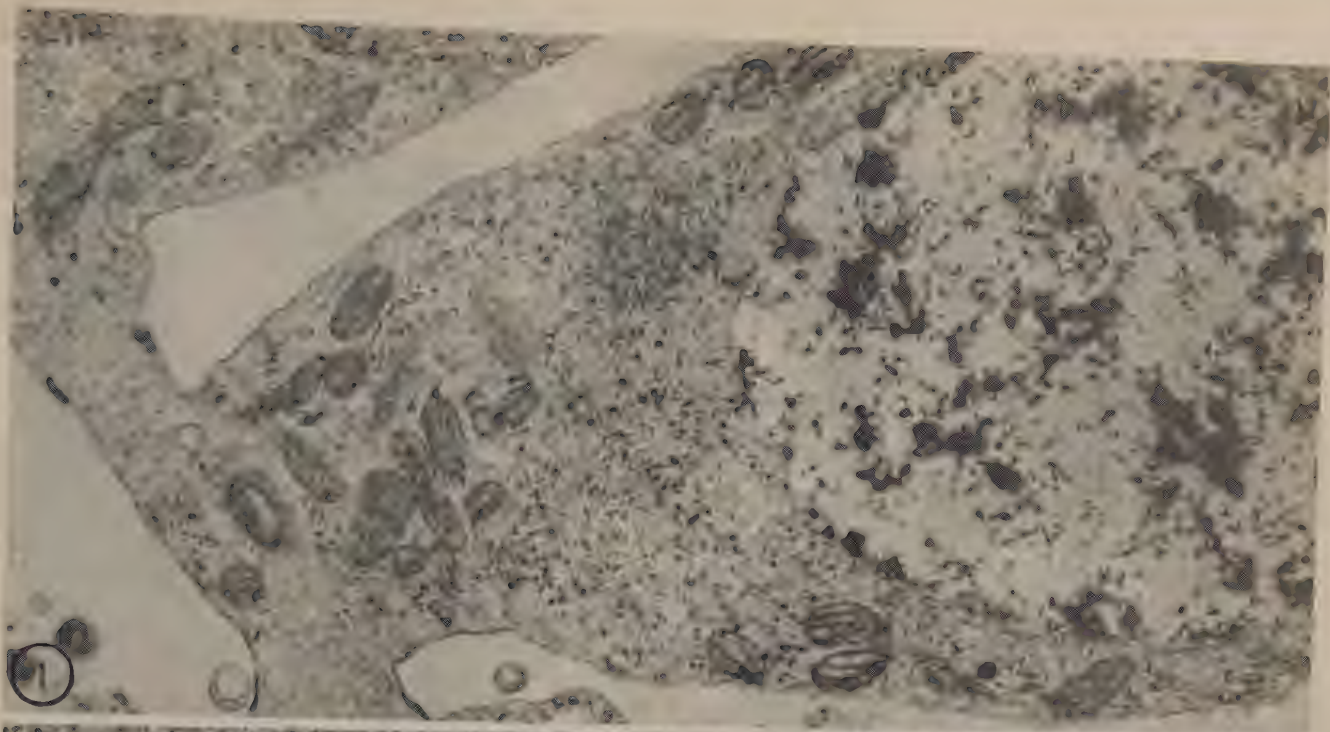


PLANCHE II

Fig. 4

Jeune spermatide d'*Hélix aspersa*. Les mitochondries à pseudomatrice fibrillaire (flèches) commencent à se grouper autour du flagelle. X 18.000

Fig. 5 à 8

Détails des mitochondries allongées à pseudomatrice remplie de matériel fibrillaire. Fig. 7 et 8 X 45.000. A un grossissement plus élevé sur les clichés 5 et 6 on voit que les fibrilles ont un centre clair (cercles) X 110.000

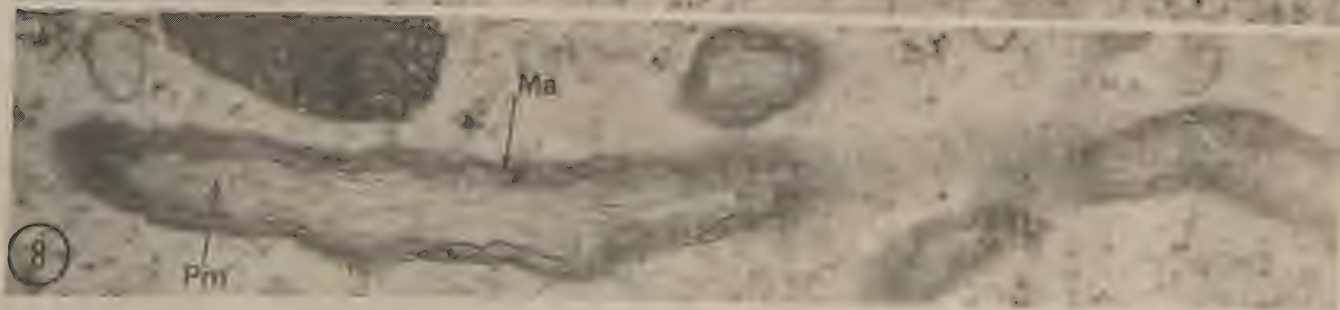
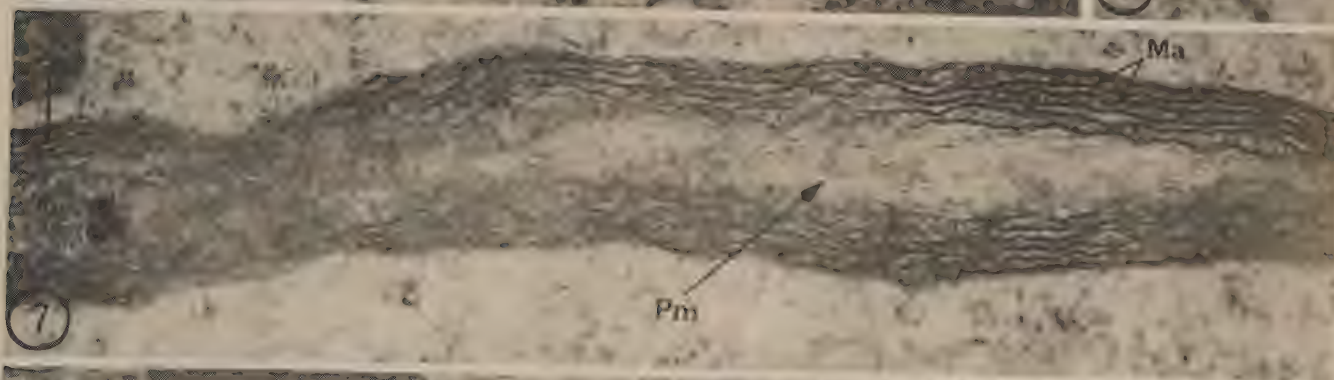
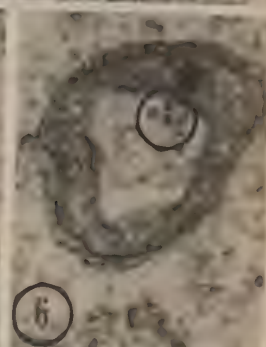
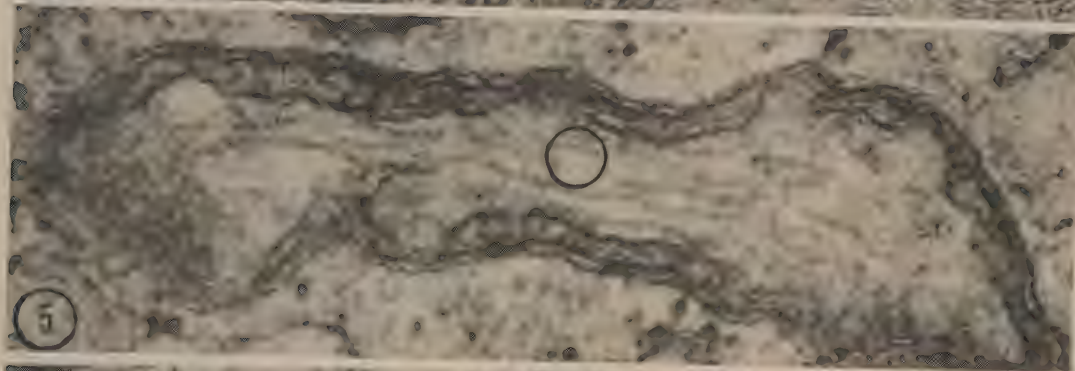


PLANCHE III

Fig. 9

Spermatide d'*Helix aspersa*. Groupement des mitochondries modifiées autour du flagelle; les fibrilles pseudomatricielles deviennent difficiles à visualiser. X 30.000

Fig. 10 & 11

Fusion des mitochondries groupées autour du flagelle. Les fibrilles ne sont pratiquement plus discernables dans la pseudomatrice qui renferme un matériel hétérogène d'apparence granulaire. X 30.000

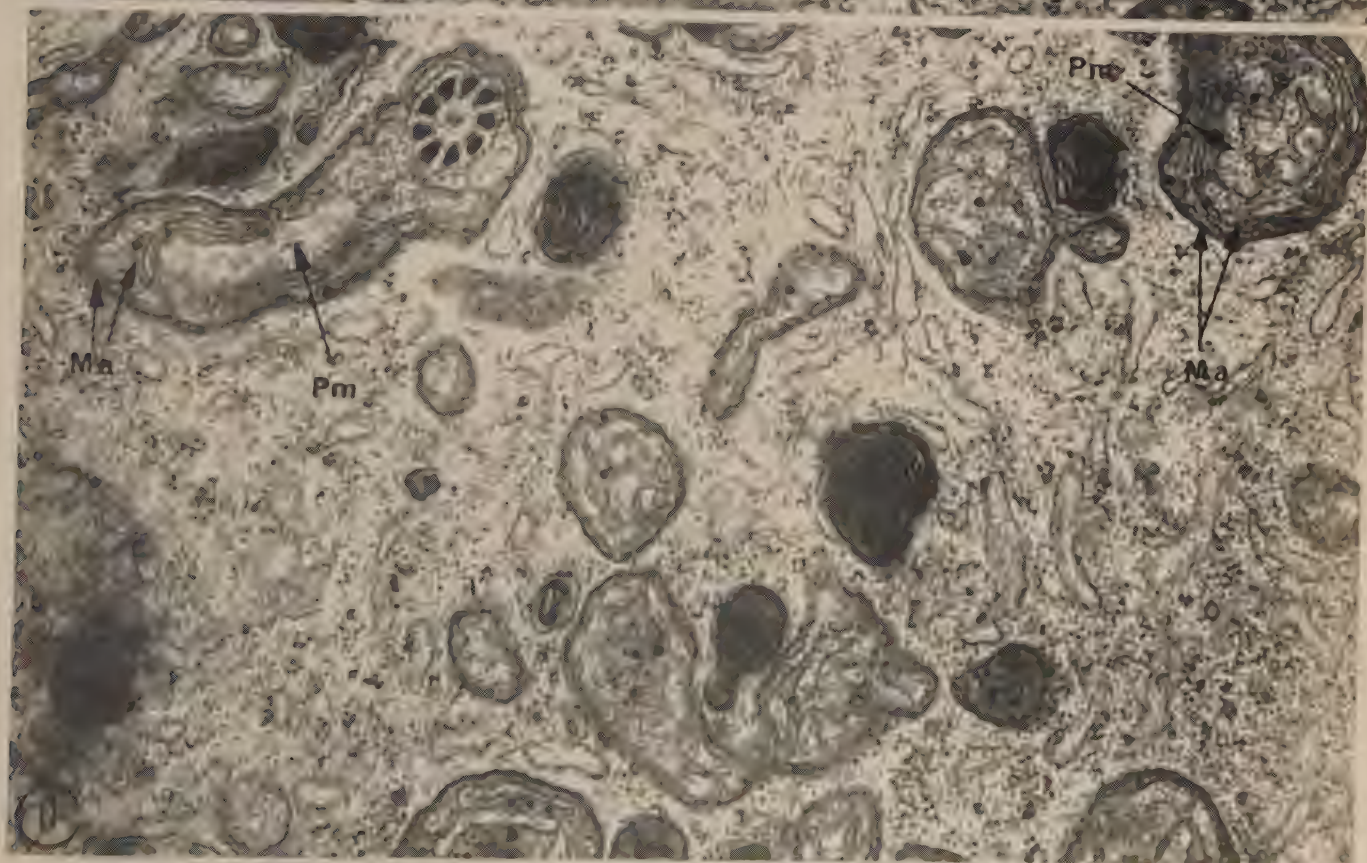
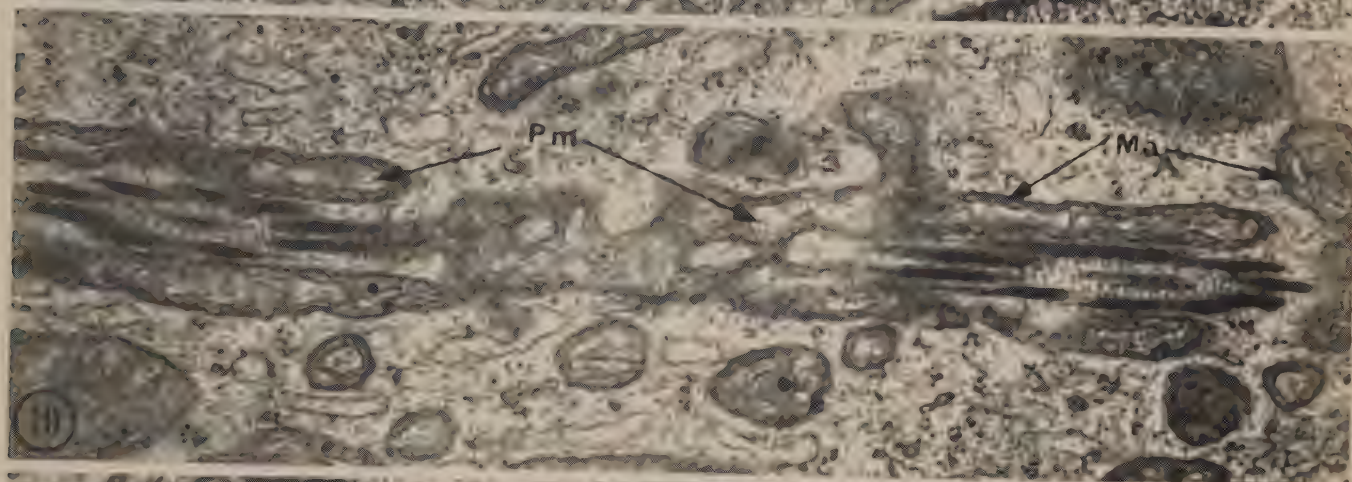


PLANCHE IV

Fig. 12 Spermatide d'*Hélix pomatia*. Les mitochondries ont des crêtes dilatées par la pseudomatrice au contenu hétérogène granulaire (flèche). La matrice se présente sous l'aspect de lames très denses. X 60.000

Fig. 13 Spermatide de Limnée montrant le matériel granulaire à l'intérieur des crêtes dilatées. On remarquera l'homogénéité de la population mitochondriale. X 30.000

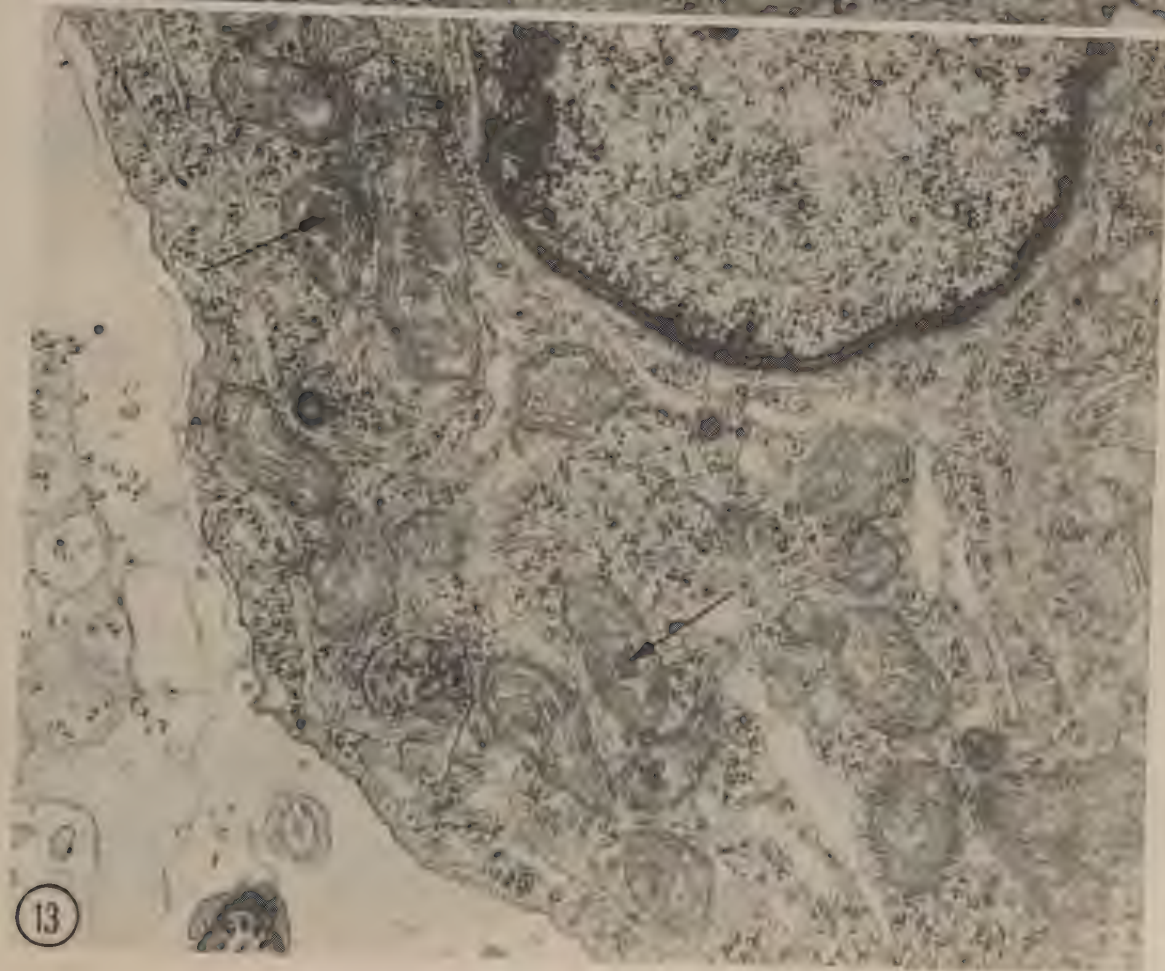
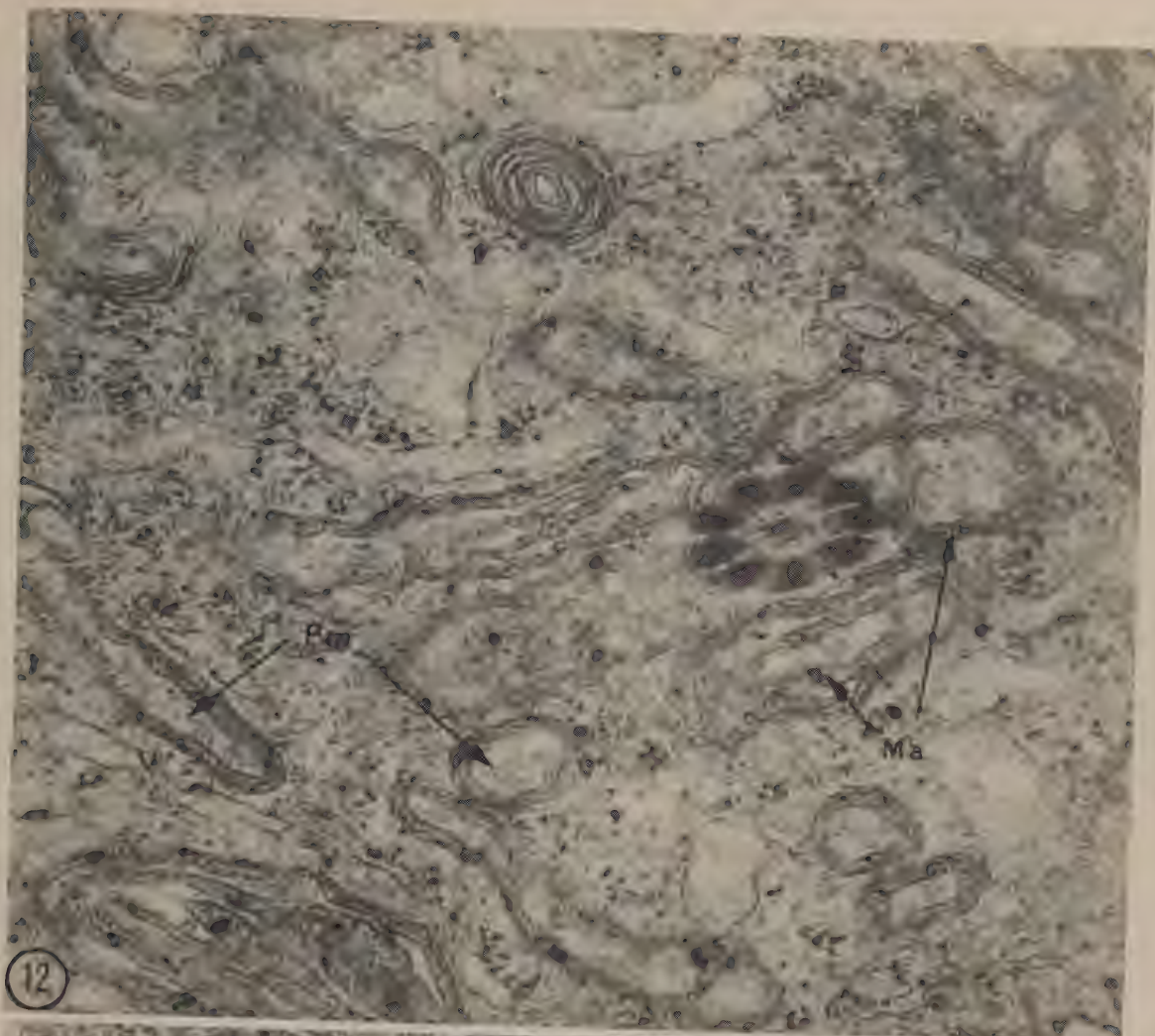


PLANCHE V

Mitochondries non incorporées dans la pièce intermédiaire de la spermatide.

Fig. 14 Macromitochondrie à structure concentrique où l'on retrouve la matrice condensée dans d'étroites lamelles séparées par les espaces pseudomatriciels dilatés remplis d'un matériel granulaire. X 52.000

Fig. 15 & 16 Certaines de ces mitochondries contractent des rapports étroits avec des vésicules dilatées du réticulum endoplasmique. X 52.000

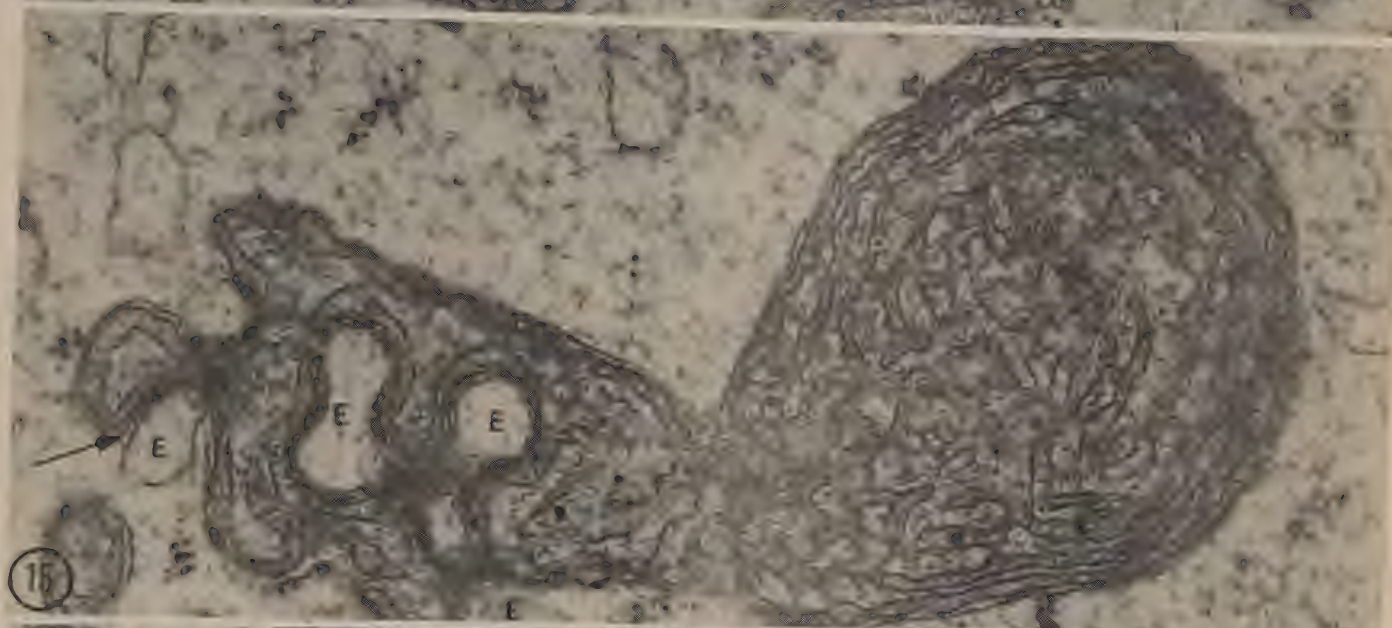
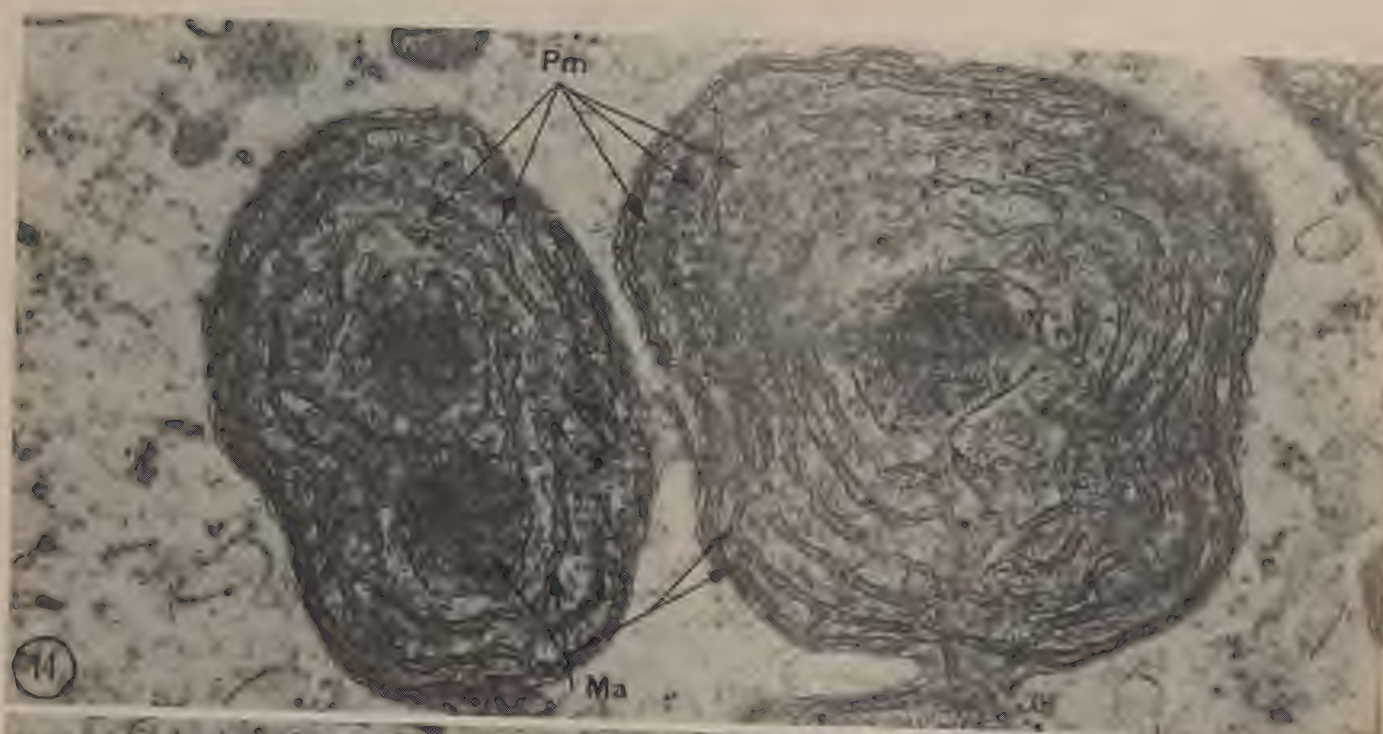


PLANCHE VI

Spermatides agées, jeunes spermatozoïdes d'*Helix aspersa* ; édification du cristal.

Fig. 17 Apparition des premiers globules (flèche double) dans la pseudomatrice le long de la membrane mitochondriale externe (Me)
a = coupe transversale dans la région antérieure de la pièce intermédiaire montrant le canal paraflagellaire (P) où commence à s'élaborer la baguette fibrillaire (Bf) b = coupe transversale dans la région postérieure de la pièce intermédiaire.
Mi = membrane mitochondriale interne, Ma = matrice, Mt = microtubules. X 70.000

Fig. 18 Coupe transversale dans la région médiane de la pièce intermédiaire. De nouvelles strates de granules se sont formées. Le matériel ordonné montre 4 secteurs : 1'un (1) constitué de rangées concentriques de grains dessinant un quadrillage, celui qui lui est diamétralement opposé (3) qui dessine des lignes noduleuses concentriques et les secteurs latéraux (2) qui font des lignes noduleuses. Il y a entre les 4 secteurs des zones de transition floues, dans lesquelles l'arrangement du matériel ordonné n'est pas décelable. X 70.000

Fig. 19 Coupe transversale dans la région antérieure de la pièce intermédiaire d'un jeune spermatozoïde. L'ensemble de la pseudomatrice est remplie par le cristal. La baguette fibrillaire de l'hélice principale est constituée (Bf)
X 70.000



PLANCHE VII

Le canal paraflagellaire ou hélice principale P

Fig. 20 Coupe longitudinale passant par la baguette fibrillaire (Bf). X.30.000

Fig.21 Présence de vésicules ergastoplasmiques à l'intérieur de l'hélice principale. X 30.000

Fig. 22 Présence de microtubules à l'intérieur de l'hélice principale. X 30.000

Fig. 23 Coupe oblique d'un spermatozoïde en cours de maturation. Des rosettes de granules fortement contrastés par le plomb apparaissent dans l'hélice principale. X 30.000

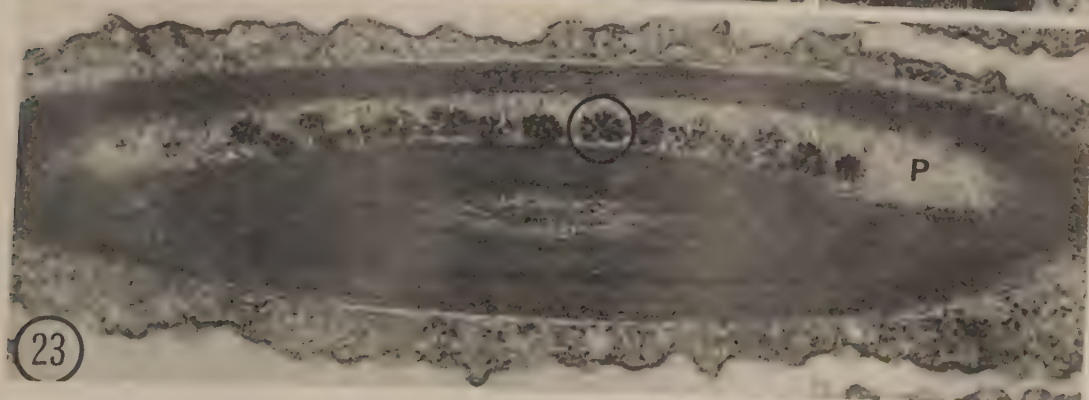
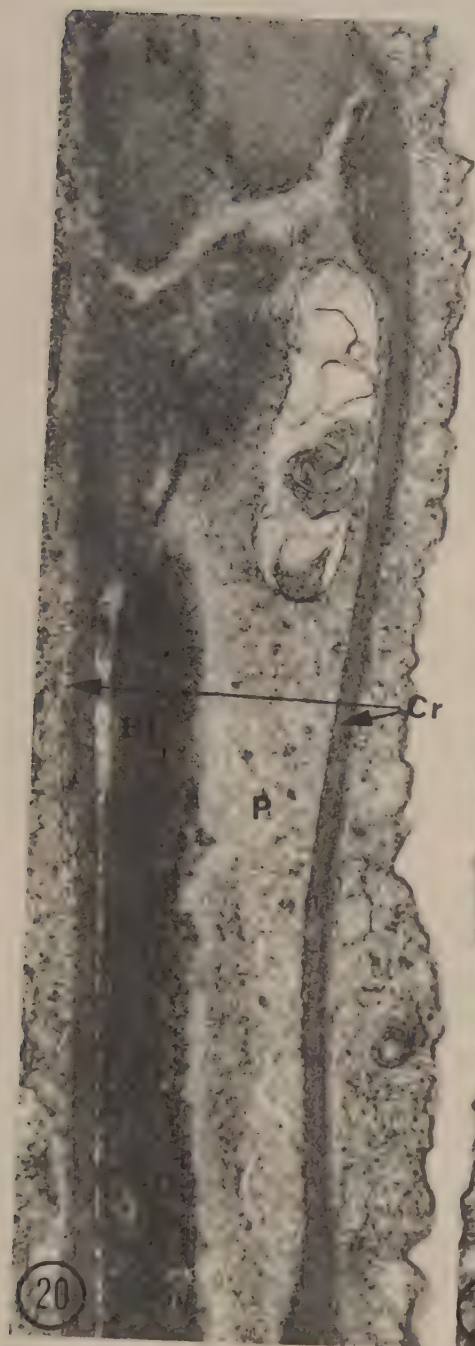


PLANCHE VIII

Fig. 24 Coupe transversale dans la région postérieure de la pièce intermédiaire d'un spermatozoïde en cours de maturation. Dans le cytoplasme résiduel, les mitochondries très pléomorphes ont leur pseudomatrice également remplie par le cristal (flèches) X 45.000

Fig. 25 & 26 Mitochondries géantes du cytoplasme résiduel dont certaines (fig. 25) peuvent également posséder un compartiment où s'accumule du glycogène (cercle) X 45.000

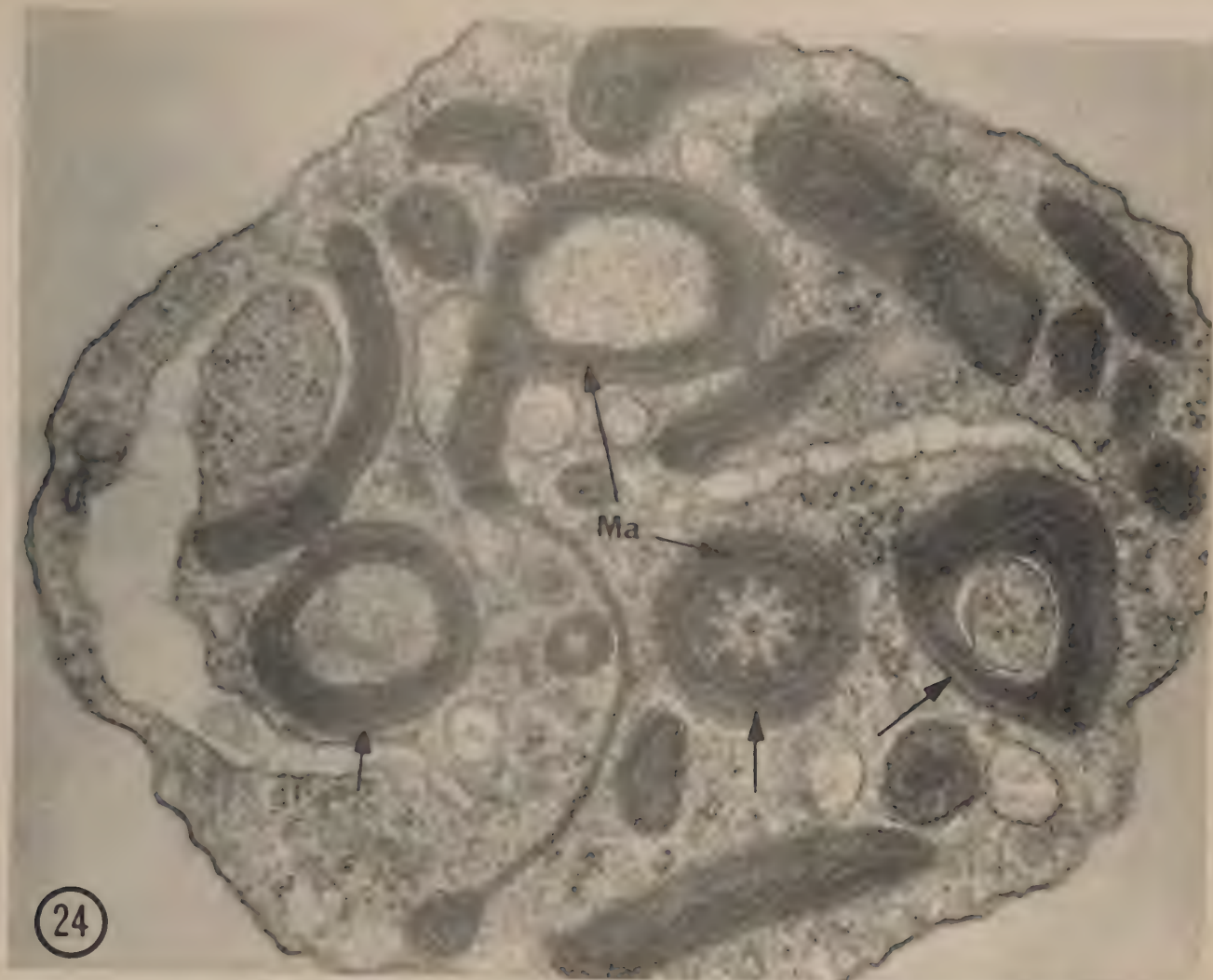


TABLEAU IX

Fig. 27 à 30

Action des Protéases

Fig. 27

Action d'un mélange délipidant (méthanol-chloroforme)

Fig. 28

Coupe transversale de la pièce intermédiaire d'un spermatozoïde de Testacelle n'ayant subi aucune action enzymatique. X 45.000

Fig. 28 & 29

Digestion trypsique

Fig. 28

Coupe transversale de la pièce intermédiaire du spermatozoïde de Testacelle après digestion par 1 trypsine. La membrane externe a disparu. Le compartiment matriciel S très éclairci, ne possède pratiquement plus que sa membrane limitante et quelques masses sombres. Dans le compartiment de glycogène P, les grains sont mieux individualisés, la substance intergranulaire ayant disparue. Le cristal est légèrement dissocié. Ses éléments constitutifs, un peu écartés les uns des autres sont bien visibles (flèche). X 45.000

Fig. 29

Incidence de coupe montrant les globules de 95 Å de diamètre reliées en files les uns aux autres par de courtes pédicules (cercle) G = glycogène X 120.000

Fig. 30

Digestion par la pan-protéase. Coupe transversale de la pièce intermédiaire d'un spermatozoïde de testacelle. On observe que le contenu des hélices a disparu à part quelques grains dans le compartiment de glycogène (P). Le cristal est fortement attaqué et a partiellement disparu. Les files de globules subsistent sous la forme de fins filaments (flèches). Cette dislocation s'accompagne d'une importante dilatation de la pièce intermédiaire. X 45.000

Fig. 31

Coupe transversale de la pièce intermédiaire d'un spermatozoïde d'Escargot après traitement par le mélange méthanol-chloroforme de Keilig. Le dérivé mitochondrial n'est pas modifié, le cristal est intact. X 45.000



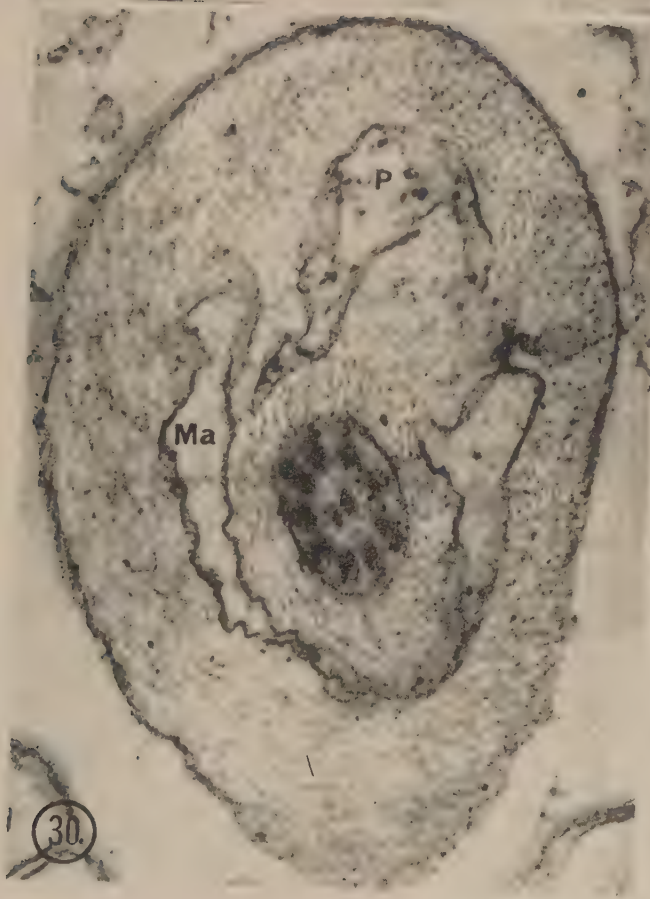
27



28



29



30



31

PLANCHE X

Action de la pepsine

Fig. 32 Coupe oblique de pièces intermédiaires de spermatozoïdes d'Escargot. Certains spermatozoïdes encore presque intacts (flèche double), voisinent avec des spermatozoïdes fortement dégradés (flèches simples) X 45.000

Fig. 33 & 34 Action de la pepsine sur coupes de spermatozoïdes de Testacelle inclus au glycol-methacrylate

Fig. 33 Témoin (coupe flottée sur le solvant de l'enzyme). Le cristal est encore présent. X 45 000

Fig. 34 Coupe flottée sur la solution d'enzyme. On observe la disparition presque complète du cristal et une dilatation de la pièce intermédiaire. X 45.000

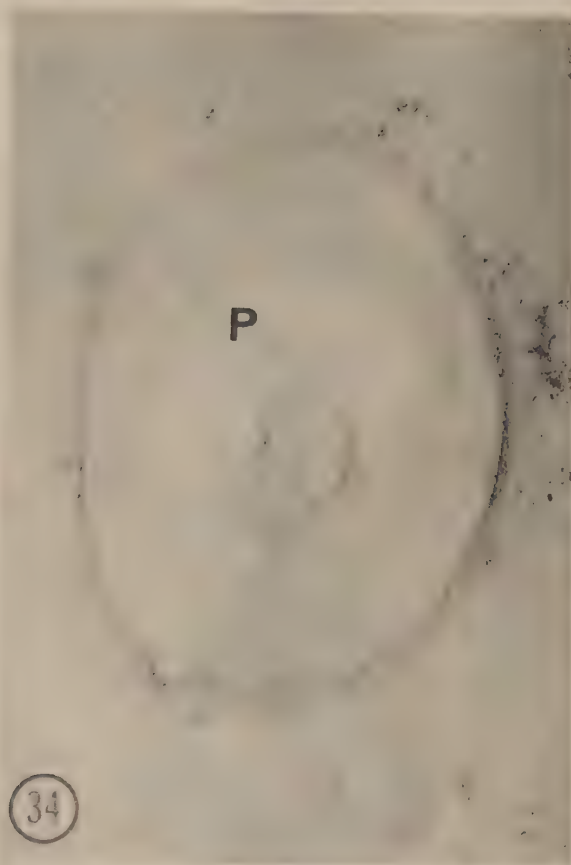
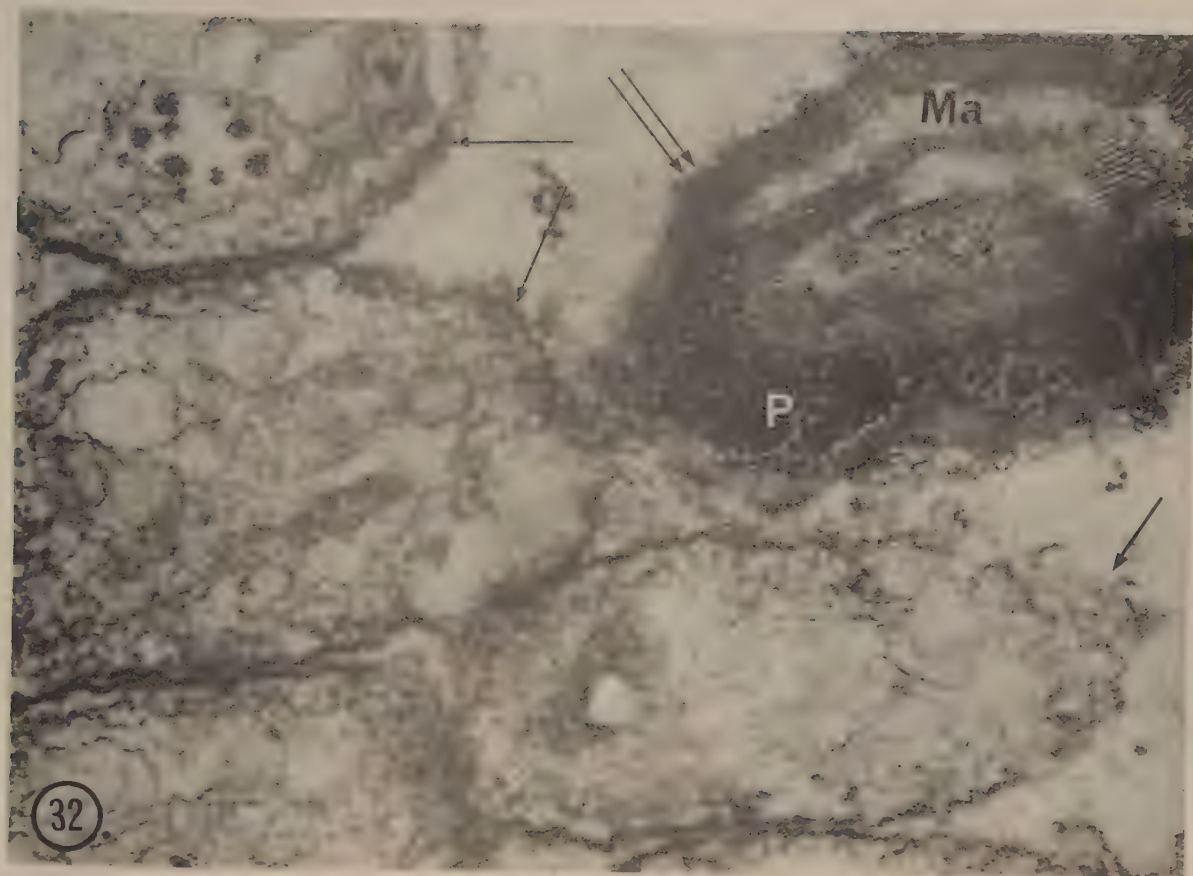


PLANCHE XI

Activité DAB oxydasique

Fig. 35 Mitochondries de spermatocyte d'Escargot après incubation dans le milieu de Novikoff et Goldfischer. Le contenu des crêtes est rempli de dépôts de grande opacité. X 30.000

Fig. 36 Coupe transversale de spermatozoïde d'Escargot en cours de maturation après incubation dans le milieu de Novikoff et Goldfischer. Un dépôt très dense aux électrons recouvre le cristal. La matrice (Ma) et le flagelle (F) en sont dépourvus. Les dépôts remplissent aussi la pseudomatrice (Pm) des mitochondries du cytoplasme résiduel. X 45.000

Fig. 37 Spermatide d'Escargot incubé dans le milieu de Novikoff et Goldfischer en présence de cyanure. On n'observe de dépôts ni sur le cristal de la pièce intermédiaire (cr) ni sur la pseudomatrice des mitochondries du cytoplasme résiduel (Pm) X 45.000

Fig. 38 Mitochondries du cytoplasme résiduel de jeunes spermatozoïdes d'escargot après incubation dans le milieu de Novikoff et Goldfischer. Les dépôts fortement opaque aux électrons remplissent la pseudomatrice (Pm) X 45.000

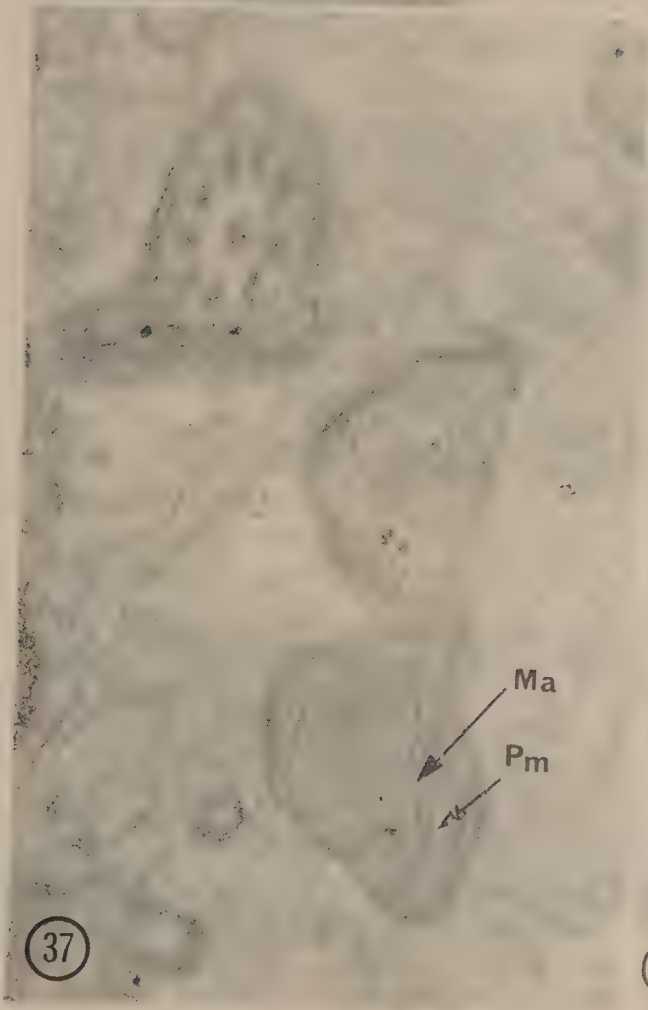
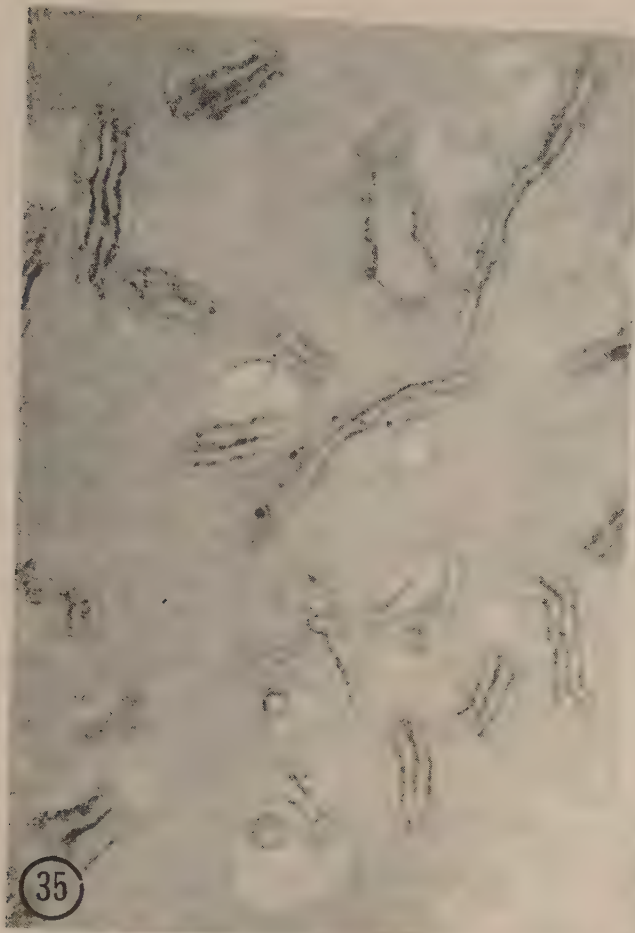


PLANCHE XII

Mise en évidence des activités succinate tetrazolium reductase (fig. 39 à 43) et NADH_2 tetrazolium reductase (fig. 44)

- Fig. 39 Coupe transversale de spermatozoïde d'Escargot incubé dans le milieu au succinate NBT, fixation glutaraldéhyde seule. Les dépôts de formazan (flèche) se localisent au niveau du compartiment matriciel. X 45.000
- Fig. 40 Coupe transversale de spermatozoïde d'Escargot incubé dans le milieu témoin au NBT en l'absence de succinate, fixation glutaraldéhyde seule. X 45.000
- Fig. 41 Coupe transversale de spermatozoïde d'Escargot incubé dans le milieu au succinate TC-NBT. Les dépôts de noir d'osmium se localisent au niveau du compartiment matriciel. X 45.000
- Fig. 42 Coupe transversale de spermatozoïde d'Escargot incubé dans le milieu témoin au TC-NBT en l'absence de succinate. X 45.000
- Fig. 43 Coupe longitudinale de spermatozoïde incubé dans le milieu au succinate TC-NBT. Les dépôts de noir d'osmium se localisent au niveau du compartiment matriciel. X 60.000
- Fig. 44 NADH_2 tetrazolium réductase. Coupe longitudinale de spermatozoïde d'Escargot incubé dans le milieu au NADH_2 et TC-NBT. Le dépôt de noir d'osmium se localise sur le compartiment matriciel. X 60.000

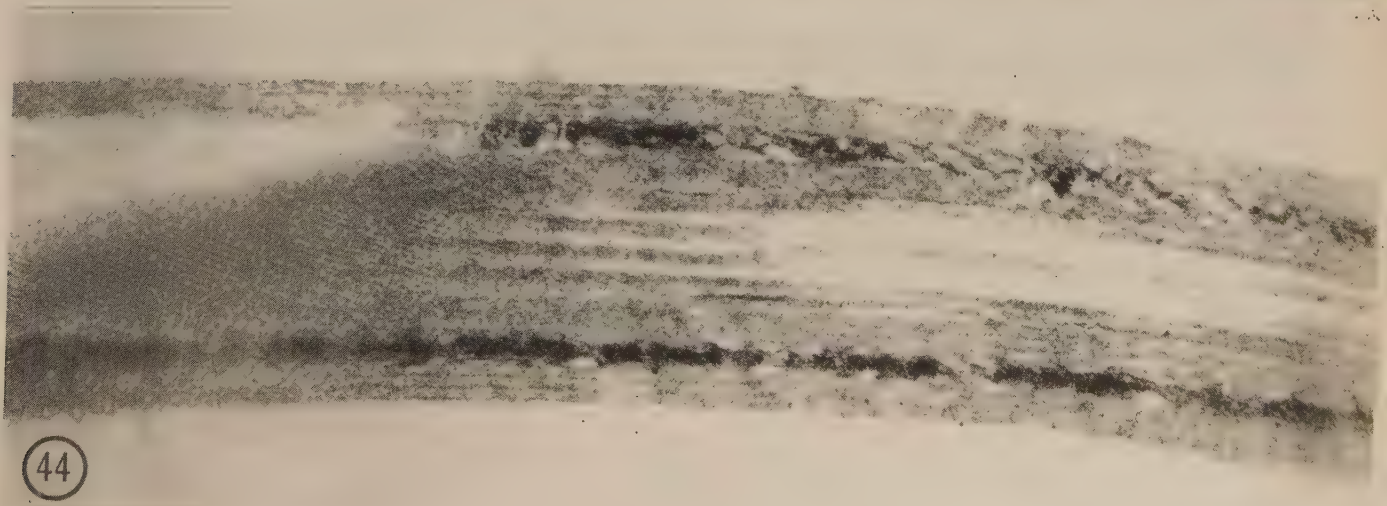
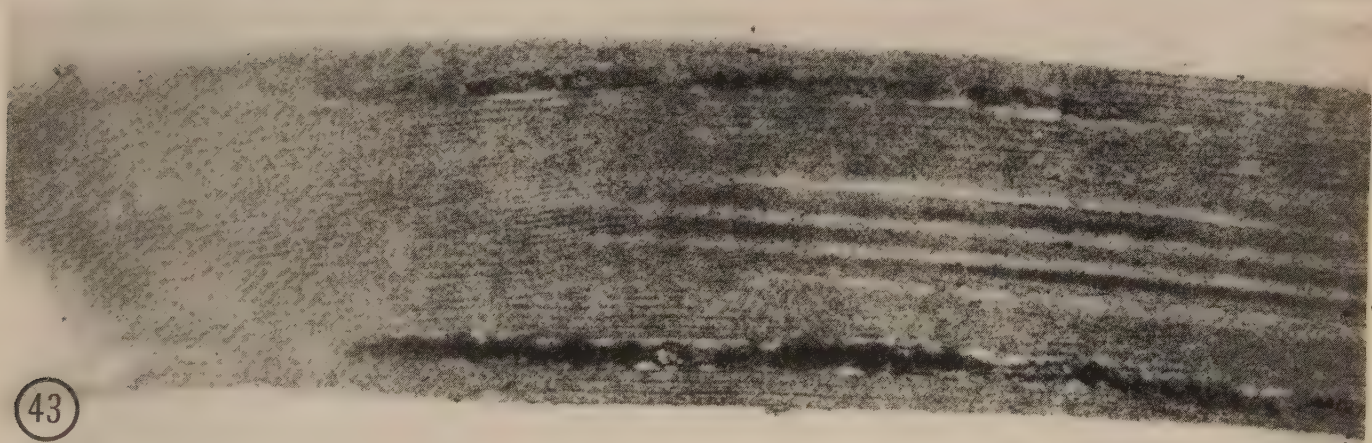
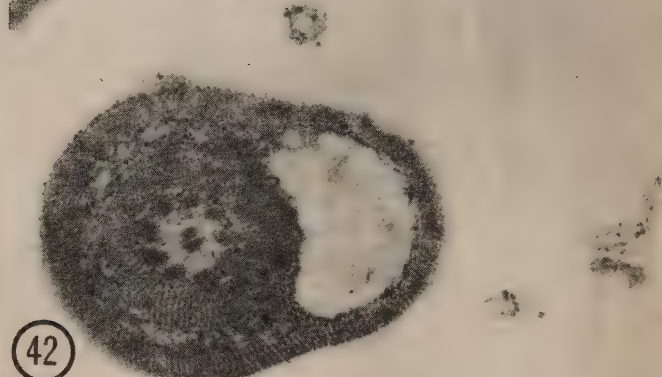
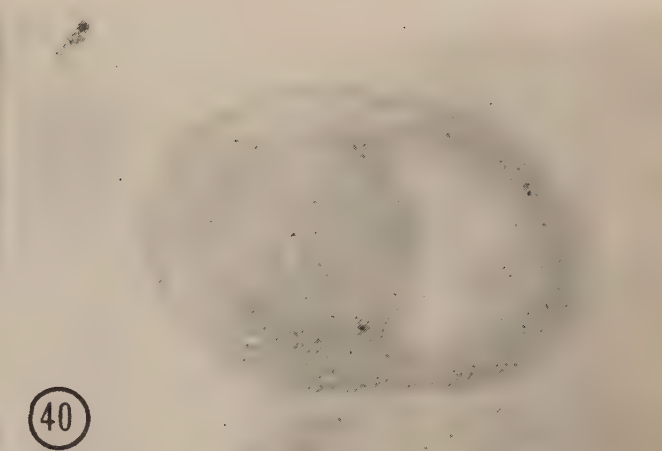
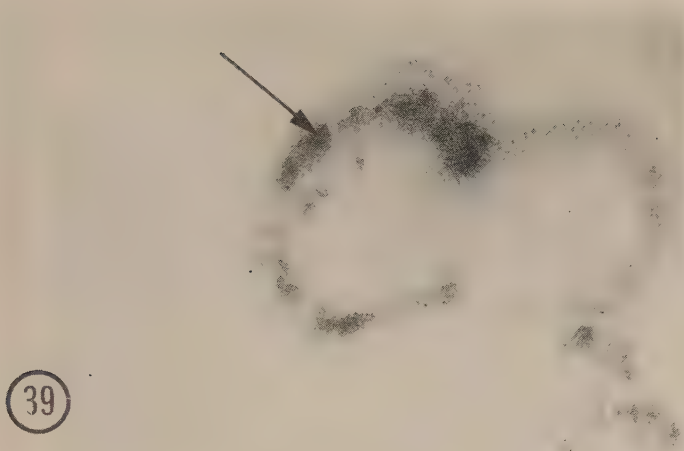


PLANCHE XIII

Mise en évidence de la Sorbitol deshydrogénase

Fig. 45 Coupe transversale de la pièce intermédiaire du spermatozoïde d'Escargot après incubation dans un milieu dépourvu de sorbitol. Il n'y a pas de dépôt de formazan. X 70.000

Fig. 46 Coupe transversale de la pièce intermédiaire du spermatozoïde d'Escargot après incubation dans le milieu au sorbitol, NAD, NBT. D'importants dépôts de formazan sont visibles dans le compartiment matriciel (Ma) et sur les grosses fibres externes du flagelle (cf.) X 70.000

Fig. 47 Coupe longitudinale de la pièce intermédiaire du spermatozoïde d'escargot après incubation dans le milieu au sorbitol, NAB, NBT. X 70.000

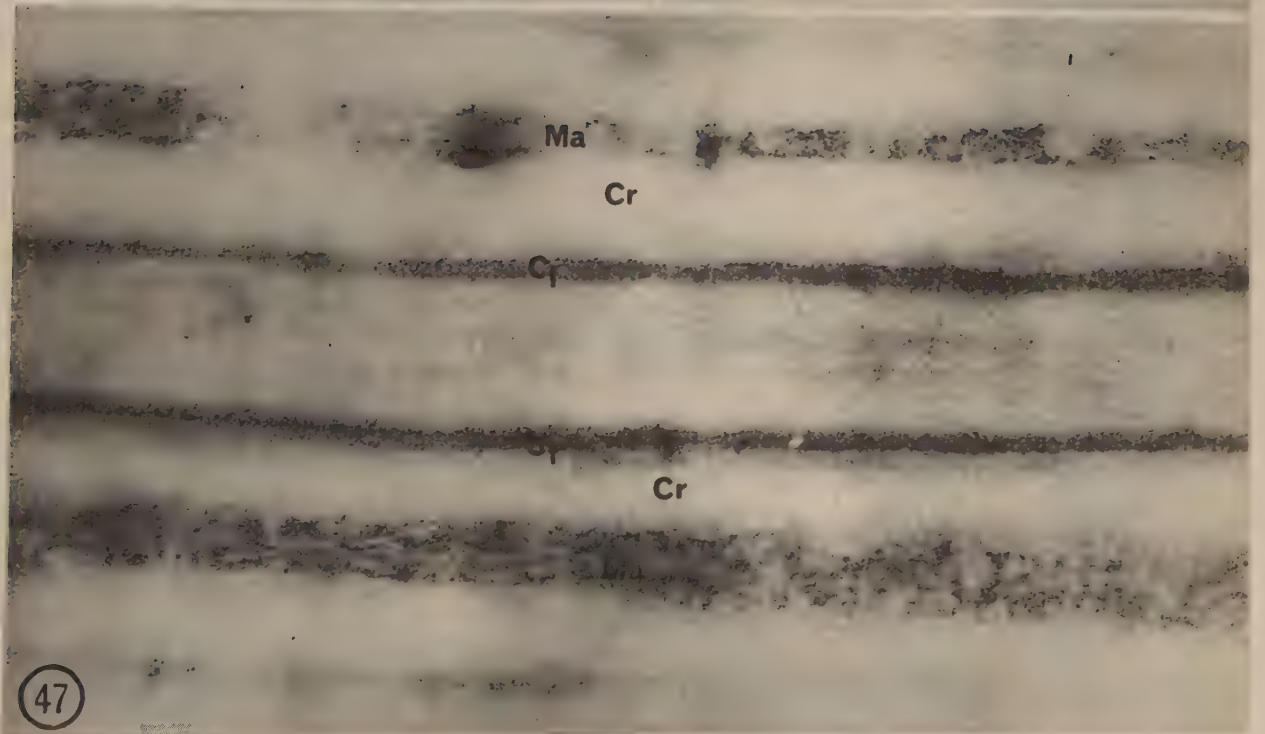


PLANCHE XIV

Le compartiment de glycogène.

Fig. 48 & 49 Action de l' α amylase sur coupes après réoxydation de l'osmium par l'eau oxygénée.

Fig. 48 Coupe transversale de spermatozoïde flottée sur l'eau distillée pendant 12 heures. Les rosettes de glycogène persistent (flèches). Coloration acétate d'uranyle plomb. X 60.000

Fig. 49 Coupe transversale de spermatozoïde flottée sur l'amylase pendant 12 heures. Les rosettes de glycogène ont disparues (flèches). Coloration acétate d'uranyle plomb. X 60.000

Fig. 50 Coupe oblique de la pièce intermédiaire du spermatozoïde d'Escargot mature. Réaction acide-périodique thiosemicarbazide protéinate d'argent. Tout le canal paraflagellaire est rempli de glycogène sous la forme monoparticulaires. Du glycogène se trouve également à l'intérieur du flagelle. X 60.000

Fig. 51 Coupe oblique de la pièce intermédiaire du spermatozoïde d'Escargot en cours de maturation. Réaction acide périodique-thiosemicarbazide-protéinate d'argent. Des rosettes de glycogène (particules de Drochmans) s'organisent dans le canal paraflagellaire. Le glycogène intraflagellaire se présente sous la forme X. 45.000

Fig. 52 & 53 Mise en évidence de la phosphorylase

Fig. 52 Coupe oblique de la pièce intermédiaire du spermatozoïde d'Escargot après incubation dans le milieu témoin sans GlP et réaction acide périodique-thiosemicarbazide-protéinate d'argent. Les particules de glycogène sont visibles. X 60.000

Fig. 53 Coupe oblique de la pièce intermédiaire du spermatozoïde d'Escargot après incubation dans le milieu au GlP et réaction acide périodique-thiosemicarbazide-protéinate d'argent. Les particules de glycogène ne sont plus discernables dans le canal paraflagellaire. La taille des particules du glycogène intraflagellaire est considérablement accrue. X 60.000

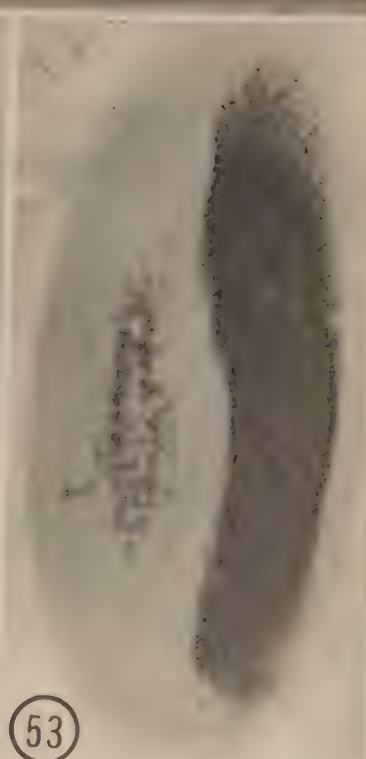
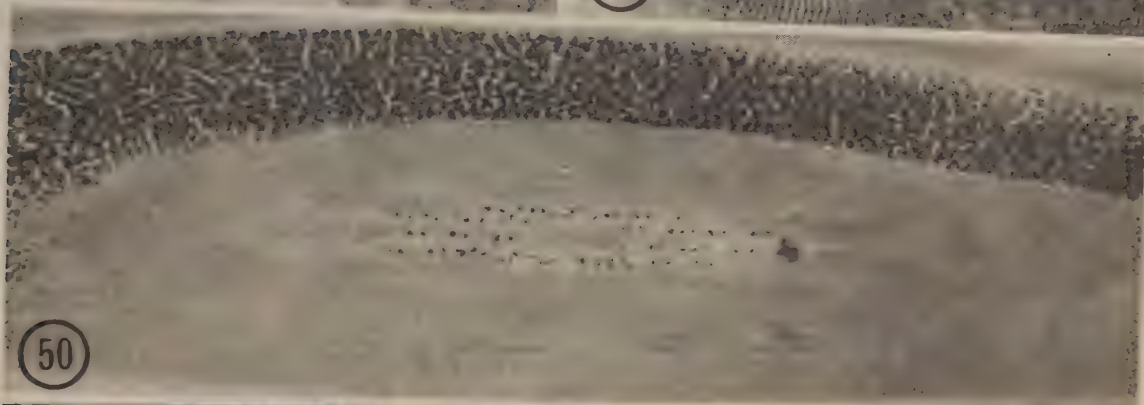
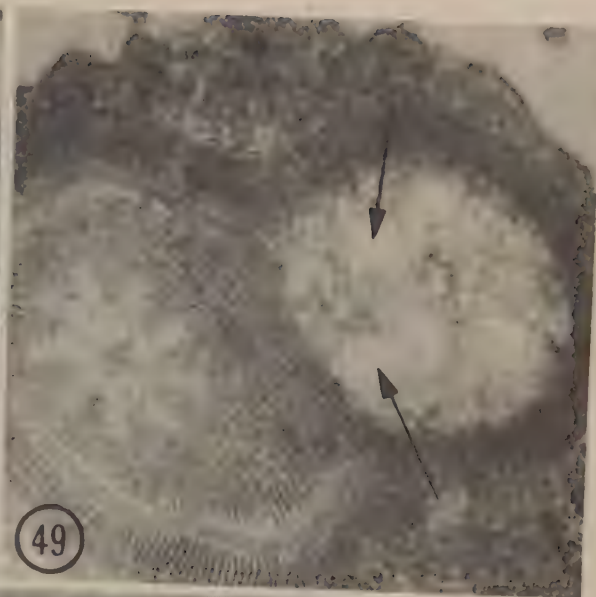
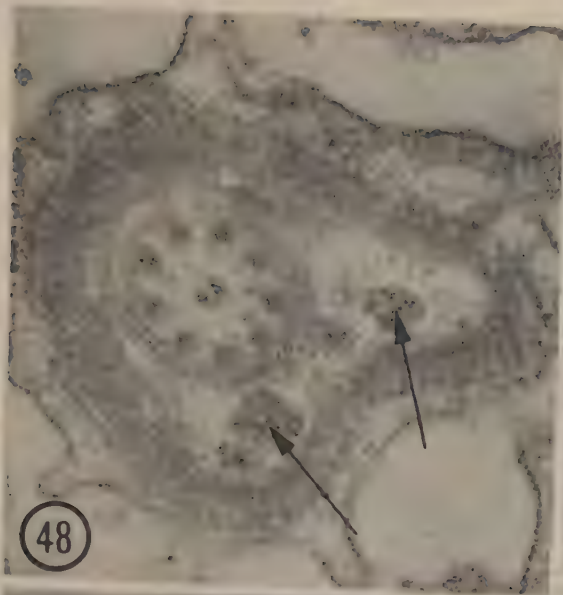


PLANCHE XV

Mise en évidence de la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase.

Fig. 54 Coupe transversale de la pièce intermédiaire du spermatozoïde d'Escargot après incubation dans le milieu de Fahimi et Karnovsky (1966) au glycéraldéhyde 3-phosphate, PMS, TNBT. Le dépôt de formazan se localise sur la matrice (Ma) et dans le compartiment de glycogène (P).
X 90.000

Fig. 55 Témoin coupe transversale de la pièce intermédiaire du spermatozoïde d'Escargot après incubation dans le milieu précédent contenant de l'iodoacetate comme inhibiteur. On n'observe pas de dépôts de formazan. X 90.000



PLANCHE XVI

Mise en évidence de la glucose-6-phosphatase

Fig. 56 Coupe transversale de la pièce intermédiaire du spermatozoïde d'Escargot après incubation dans le milieu au Glucose 6-phosphate nitrate de plomb. D'importants dépôts de phosphate de plomb sont visibles au niveau de la membrane (flèche) limitant la matrice (Ma) et dans le flagelle. X 60.000

Fig. 57 Coupe transversale de la pièce intermédiaire du spermatozoïde d'Escargot après incubation en l'absence de glucose 6-phosphate. Quelques dépôts sont visibles à la surface du spermatozoïde. X 60.000

Fig. 58 Coupe oblique de la pièce intermédiaire du spermatozoïde d'Escargot après incubation dans le milieu au glucose 6-phosphate. X 60.000

Fig. 59 Coupe oblique de la pièce intermédiaire du spermatozoïde d'Escargot après incubation en l'absence de glucose 6-phosphate. X 60.000

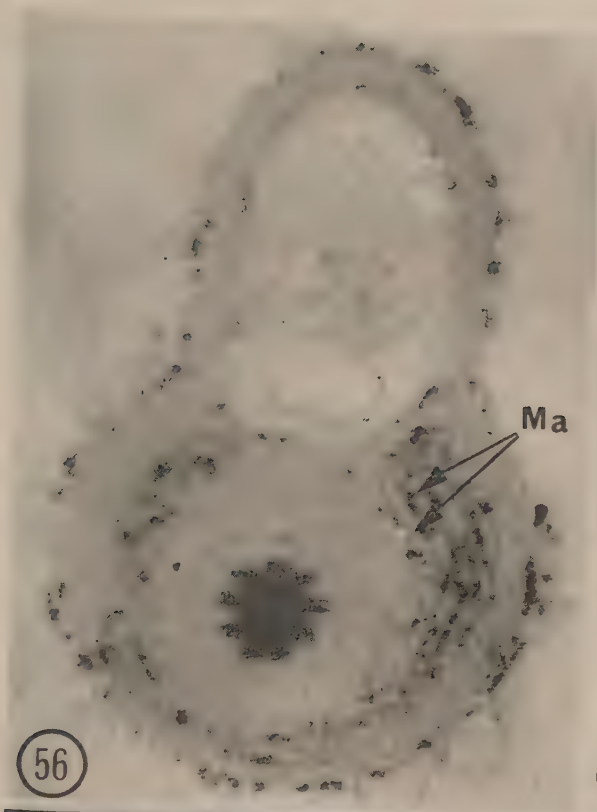


PLANCHE XVII

Région du "Col" des spermatozoïdes

Fig. 60 Coupe oblique dans la région du col.
Un entonnoir sépare la base du noyau (N) de la région apicale de la pièce intermédiaire et se prolonge à l'intérieur de cette dernière par le canal paraflagellaire ou hélice principale (P). Le matériel dense (D) qui occupe la majeure partie de cet "entonnoir" entoure l'axonème et se prolonge par une formation périodique dans l'hélice principale (P). Cette formation est en continuité avec la baguette fibrillaire ou "côte" (C) X 72.000

Fig. 61 Le matériel de structure périodique occupant la région apicale de l'hélice principale (P) est en continuité avec la côte (C) X 72.000



PLANCHE XVIII

Fig. 62 Coupe longitudinale de la région du col et de la portion apicale de la pièce intermédiaire montrant l'hélice principale qui vient former un entonnoir entre la base du noyau et le dérivé mitochondrial. X 60.000

Fig. 63 Coupe longitudinale du dérivé mitochondrial du spermatozoïde d' *Helix aspersa*. Le matériel ordonné se présente sous l'aspect de lignes longitudinales (cercles) et de lignes obliques par rapport à l'axe du spermatozoïde (flèches). Les lignes longitudinales sont les traces des plans réticulaires A et les lignes obliques les traces des plans réticulaires B sur ce plan de coupe. X 30.000

62



63

ANNEXE

- n° 1 Etude cytochimique du dérivé mitochondrial du spermatozoïde de la Testacelle : recherche des protéines et des lipides (*J. Microscopie*, 1965, 4, 627-642).
- n° 2 Compartimentage des activités enzymatiques dans le spermatozoïde de certains mollusques Gastéropodes.
1. Localisation des déshydrogénases (*J. Cell Science*, 1969, 4, 693-707).
- n° 3 Existence de glycogène mitochondrial dans le spermatozoïde de la Testacelle (*J. Microscopie*, 1964, 3, 643-650).
- n° 4 Localisation mitochondriale d'enzymes liées au métabolisme du glycogène dans le spermatozoïde de l'Escargot (*J. Cell Biol.*, 1970, 44, 20-28).
- n° 5 Chemical compartmentalization in *Helix* spermatozoa. (*J. Microscopie*, 1968, 7, 367-390).
- n° 6 The cytochemical localization of sorbitol deshydrogenase activity in spermatozoa of *Helix aspersa*. (*J. Microscopie*, 1969, 8, 97-102).
- n° 7 Etude comparée des évolutions mitochondriales au cours de la spermatogenèse chez quelques Gastéropodes (*Symposium on Comparative Spermatology*. Rome-Sienne, Baccetti ed. 1970).
- n° 8 The cytochemical localization of glycolytic and oxidative enzymes within mitochondria of spermatozoa of some pulmonate gastropods. (*J. Histochem. Cytochem.*, 1970, 18, 783-793).

ÉTUDE CYTOCHIMIQUE
DU DÉRIVÉ MITOCHONDRIAL
DU SPERMATOZOÏDE DE LA TESTACELLE :
RECHERCHE DES PROTÉINES ET DES LIPIDES

Paul PERSONNE

Collège Scientifique Universitaire, Amiens, France

Les mitochondries se modifient pendant la spermatogenèse de façon plus ou moins importante selon les groupes animaux. Dans certains cas, les transformations sont si complexes qu'elles aboutissent à la constitution, dans la pièce intermédiaire du spermatozoïde, d'une structure nouvelle dont la nature mitochondriale ne peut-être reconnue que si l'on suit son apparition et son évolution. On parle alors de « *métamorphose mitochondriale* » (André, 1962).

C'est d'un tel corps mitochondrial à structure et ultrastructure aberrantes que nous avons entrepris l'étude cytochimique. Nous avons choisi celui de la Testacelle en raison de sa taille importante (500 à 600 microns de long et près d'un micron de diamètre) qui facilite son observation au microscope ordinaire, et en raison de la bonne connaissance que l'on a de son ultrastructure à la suite des travaux d'André.

La pièce intermédiaire du spermatozoïde de la Testacelle (Figure 1; Pl. IV, fig. c) comporte, selon son axe, les fibres axonématiques du flagelle entourées d'une membrane simple; à sa périphérie, elle est entourée d'une membrane plasmatique normale. C'est entre ces deux membranes qu'est situé le dérivé mitochondrial qui fait l'objet de cette étude.

La majeure partie du volume mitochondrial est faite d'un matériel cristallin de forme complexe : il constitue deux manchons, l'un interne, cylindrique, de position périflagellaire, l'autre externe, sculpté de trois nervures hélicoïdales, alternant avec trois sillons hélicoïdaux. Des trois nervures, l'une, plus saillante est dite *principale*, tandis que les deux

autres sont dites *secondaires*. L'espace entre les deux manchons délimite trois canaux hélicoïdaux logés dans les nervures, qui sont nommés les *hélices*. Dans la nervure principale est logée l'*hélice principale* qui contient un matériel granulaire, et dont l'angle externe est souvent occupé par un enroulement membraneux de type myélinique. Dans les nervures secondaires sont logées les *hélices secondaires* qui contiennent un matériel homogène parcouru de membranes paires.

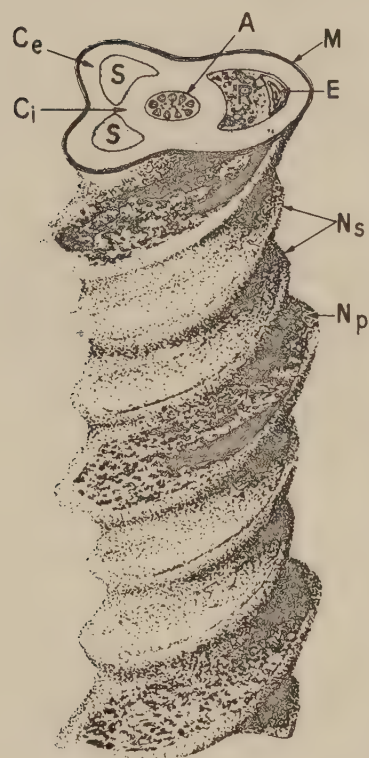


FIGURE 1. Ultrastructure de la pièce intermédiaire. Schéma tridimensionnel de la pièce intermédiaire du spermatozoïde de la Testacelle. Les hélices sont supposées vues par transparence au travers du cristal.

La recherche des glucides nous a permis de montrer que le matériel granulaire de l'hélice principale est du glycogène sous la forme β (Personne et André, 1964). Dans le présent travail, nous complétons cette recherche par celles des protéines et des lipides.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Nous utilisons l'espèce *Testacella haliotidea* Drap. (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata). Faute de ce matériel rare qu'est la Testacelle, nous avons été amené à poursuivre certaines expériences sur l'espèce apparentée *Helix pomatia* L., la pièce intermédiaire du spermatozoïde de cet Escargot présentant de fortes ressemblances ultrastructurales avec celle de la Testacelle (Grassé et coll., 1956; Tahmisian, 1964; André, com. pers.).

La glande hermaphrodite est disséquée, fragmentée, et, selon les cas, fixée, mise en frottis ou dissociée dans le milieu d'incubation.

I. RECHERCHE DES PROTIDES

Les techniques pour la microscopie ordinaire sont indiquées dans le Tableau I.

Les techniques pour la microscopie électronique sont les suivantes. Nous incubons les cellules non fixées dans les milieux et pour les temps suivants : trypsine (Nutritional Biochemical Corporation) à 1 mg/ml dans un tampon phosphate 0,05 M à pH 7,3, pendant une heure, à 37°; trypsine à 0,2 mg/ml dans un tampon borate 0,05 M à pH 8,9, pendant une heure, à 37°; chymotrypsine (Nutritional Biochemical Corporation) à 1 mg/ml dans un tampon phosphate 0,05 M à pH 7,3 pendant une heure, à 37°; Pan-protéase (Worthington) à 1 mg/ml dans un tampon phosphate 0,05 M à pH 7,9, pendant une heure, à 37°; papaïne (Sigma) à 1 mg/ml dans un tampon phosphate 0,05 M à pH 7,3, pendant une heure, à 37°; pepsine (Nutritional Biochemical Corporation) à 0,5 mg/ml, 0,3 mg/ml, ou 0,1 mg/ml dans HCl 0,02 N à pH 2, pendant 15 à 30 min., à 37°. Après l'incubation, les cellules sont fixées au tétroxyde d'osmium à 2 % dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4 selon Millonig (1961) pendant une heure, incluses dans l'Epon selon Luft (1961), puis colorées à l'acétate d'uranyle et à l'hydroxyde de plomb selon Karnovsky (1961).

La digestion pepsique a également été pratiquée sur coupe ultrafine après inclusion dans le glycol-méthacrylate (Leduc et coll., 1963) selon la technique de Leduc et Bernhard (1961) : fixation au formol-acroléine (5 % de chacune des deux solutions commerciales dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,3) pendant 30 minutes, lavage pendant 15 minutes dans le tampon, inclusion dans le glycol-méthacrylate, digestion par une solution de pepsine à 0,5 % dans HCl 0,1 N pendant 30 minutes ou une heure, à 37°.

La digestion par la trypsine a aussi été effectuée dans les mêmes conditions de milieu, concentration, durée et température que celles indiquées précédemment, sur de petits fragments de tissus préalablement fixés à la formaldéhyde (formol à 5 % dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4 pendant 20 minutes à la température du laboratoire).

II. RECHERCHE DES LIPIDES

Cette recherche a été faite au microscope ordinaire sur des frottis et des coupes à congélation de tissus frais ou fixés au formol-calcium de Baker. Pour la recherche des lipides masqués (Ciaccio, 1926), le démasquage a été effectué, soit lors de la fixation en utilisant le liquide de Da Fano, soit après fixation au formol-calcium en traitant les coupes par des solutions d'acide oxalique à 20 % ou d'acide acétique à 25 % selon la méthode d'Ackerman (1952). Les réactions utilisées sont indiquées dans le Tableau II.

Pour la microscopie électronique, nous avons traité les tissus par le mélange délipidant, méthanol-chloroforme, de Keilig (1944), selon le procédé proposé par Idelman (1964) : fixation à la formaldéhyde (formol à 10 % dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4), ou au formol-acroléine, pendant 30 minutes à 4°; incubation dans le mélange à parties égales de méthanol et de chloroforme pendant 24 heures à 60°; réhydratation par passage dans des alcools de concentration décroissante; lavage au tampon pendant 15 minutes; post-fixation au tétroxyde d'osmium; inclusion dans l'Epon et coloration à l'acétate d'uranyle-complexe de plomb comme indiqué ci-dessus.

OBSERVATIONS

I. RECHERCHE DES PROTIDES

A. MICROSCOPIE ORDINAIRE

Traitée par divers réactifs des protides (Tableau I), la pièce intermédiaire se colore de façon diffuse sans localisation préférentielle.

Le bleu de bromophénol mercurique (Bonhag, 1955) colore la pièce intermédiaire dans son ensemble, les trois hélices étant plus intensément colorées (Pl. I, fig. a). Après action de la pepsine, la coloration est très atténuée, et la structure hélicoïdale n'est plus visible. Seul, l'axe reste

fortement coloré. La trypsine, par contre, ne modifie pratiquement ni la répartition ni l'intensité de la coloration.

Traitée selon la technique de Yasuma et Ichikawa (1953) à la ninhydrine-Schiff (Pl. I, fig. b) ou de Lillie (1958) à la chloramine T-Schiff, la pièce intermédiaire réagit positivement; aucune coloration n'apparaît si l'on fait précéder cette action d'une désamination par l'acide nitreux. La pièce intermédiaire est positive au réactif de Chèvremont et Frédéricq (Bacq et coll., 1943) et DDD selon Barnett et Seligman (1952). Elle est fortement Schiff-positive après traitement par l'acroléine selon P. Van Duijn (1961) (Pl. I, fig. e); la coloration est inhibée par l'acétylation (Pl. I, fig. f). Le liquide de Millon réagit de façon diffuse et peu intense. La réaction au dinitrofluorobenzène (Burstone, 1955, 1959; Danielli, 1947, 1948) est positive.

La pièce intermédiaire se colore par le fast-green à pH 8,1 (Alfert et Geschwind, 1953), très faiblement sans prétraitement à l'acide trichloracétique (Pl. I, fig. c), et de façon intense après prétraitement (Pl. I, fig. d).

Ces résultats indiquent la présence de protides dans la pièce intermédiaire sans que nous puissions les localiser avec précision.

B. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Nous n'avons pas observé de digestion par la trypsine sur le matériel préalablement fixé au formol à la température ordinaire. Mais, si les cellules sont incubées *sans fixation*, on observe les résultats suivants :

— la *trypsine* (Pl. II, fig. b et d) fait disparaître la plupart des membranes et dissocie légèrement le cristal, dont la structure devient plus visible. Certaines incidences de coupe montrent que le réseau est formé de globules de 95 Å de diamètre reliés en files par de courts pédicules (Pl. II, fig. d). Les coupes bien perpendiculaires aux files de globules montrent que ceux-ci présentent un centre clair de 30 Å de diamètre. Les hélices secondaires sont très éclaircies et ne possèdent pratiquement plus que leurs membranes limitantes et les membranes internes. Dans l'hélice principale, les grains de glycogène (Personne et André, 1964) sont mieux individualisés, la substance intergranulaire ayant disparu.

— la *chymotrypsine* a une action identique mais plus faible.

— la *pan-protéase* (Pl. II, fig. c) a une action plus poussée. On observe une dilatation importante de la pièce intermédiaire. Le cristal devient moins bien ordonné; ses éléments subsistent sous la forme de fins filaments. Les hélices sont vidées de leur contenu.

— la *papaïne* (Pl. II, fig. e) fait disparaître complètement le cristal. Il ne reste plus de la pièce intermédiaire que l'axe flagellaire entouré

TABEAU I : PROTIDES

RÉACTION	MÉTHODE	FIXATEUR	RÉSULTATS ET OBSERVATIONS
— Bleu de bromophénol mercurique (Bonhag, 1955)	F, P	H, F, C, B	+ les trois hélices colorées, les deux secondaires plus intensément
— Bleu de bromophénol mercurique après digestion tryptique (0,2 mg/ml dans un tampon borate 0,05 M à pH 8,9, 1 heure à 37°)	F	F (30 min. à 4°)	+ la coloration subsiste
— Bleu de bromophénol mercurique après digestion pepsique (pepsine 0,2 mg/ml dans HCl 0,02 N, 30 minutes à 37°)		F (30 min. à 4°)	— la coloration est fortement atténuée
— Acroléine-Schiff (P. Van Duijn, 1961)	P	H, C	+ les trois hélices sont colorées
— Acroléine-Schiff après acétylation (P. Van Duijn, 1961)	P	H, C	— la pièce intermédiaire n'est plus colorée
— Chloramine T-Schiff, 6 heures à 37° (Burstone, 1955)	P	H	+ faible coloration de l'ensemble de la pièce intermédiaire
— Ninhydrine-Schiff (Yasuma et Ichikawa, 1953)	P	H, F	+ faible coloration de l'ensemble de la pièce intermédiaire

— Ninhydrine-Schiff après désamination par l'acide nitreux (Lillie, 1958)	P	H, F	— la pièce intermédiaire n'est plus colorée
— Ferricyanure ferrique (Bacq, Chèvremont et Frédéricq, 1943)	P, C	F, F-cal	+ coloration générale diffuse de la pièce intermédiaire
— DDD (Barnett et Seligman, 1952)	P	F	+ coloration générale de la pièce intermédiaire
— Réaction de Millon (Bensley et Gersh, 1953)	P	H, F, C	+ coloration générale diffuse de la pièce intermédiaire
— Dinitrofluorobenzène (Danielli, 1947, 1948; Burststone, 1955, 1959)	P	B	+ les trois hélices sont colorées
— Fast-green alcalin (Alfert et Geschwind, 1953)	F, P	F	la pièce intermédiaire est à peine colorée
— Fast-green alcalin après traitement par l'acide trichloracétique 5 %, 15 minutes à 90° (Alfert et Geschwind, 1953)	F, P	F	+ très forte coloration de la pièce intermédiaire

MÉTHODES : F, frottis; P, coupes à la paraffine; C, coupe à congélation.

FIXATEURS : B, Bouin; C, Carnoy; F, formol 10 %; F-cal, formol-calcium; H, Helly; Fl, Fleming.

de feuilletts membraneux concentriques. Après cette action, il est très difficile de reconnaître les différentes régions.

— la *pepsine* a une action très intense. Une solution à 0,5 mg/ml agissant pendant une demi-heure ne laisse persister que les fibres axonématiques du flagelle. Celles-ci sont entourées de nombreuses vésicules membraneuses qui proviennent vraisemblablement de la réassociation en vésicules des membranes fragmentées par l'enzyme. Les enroulements membraneux à allure myélinique de l'hélice principale sont conservés. Poursuivies chez l'Escargot, ces expériences nous ont permis de confirmer cette forte sensibilité à la pepsine. Après incubation dans une solution à 0,5 mg/ml, 0,3 mg/ml pendant 15 minutes, ou à 0,1 mg/ml pendant 30 minutes, on observe les mêmes résultats que ceux que nous venons de décrire chez la Testacelle. Mais si le traitement par une solution à 0,1 mg/ml ne dure que 15 minutes, on assiste au début de l'action enzymatique : certains spermatozoïdes encore presque intacts voisinent avec des spermatozoïdes fortement dégradés (Pl. III, fig. a). Nous avons également étudié l'action de la pepsine sur des coupes de spermatozoïdes inclus dans le glycol-méthacrylate selon la technique de Leduc et Bernhard (1961). La pièce intermédiaire est considérablement dilatée, et le cristal disparaît (Pl. III, fig. b et c).

II. RECHERCHE DES LIPIDES

A. MICROSCOPIE ORDINAIRE

Les résultats concernant les lipides sont indiqués dans le Tableau II.

Les réactions de Smith-Dietrich (Dietrich, 1910; Smith et coll., 1909, 1911) et de Baker (1946) colorent la pièce intermédiaire dans son ensemble. La coloration par l'hématéine acide subsiste après action de la pyridine (test de Baker, 1946).

Les spermatozoïdes fixés au formol-calcium pendant 6 heures ne réagissent pas avec le noir soudan B (Pl. IV, fig. a) ni le sulfate de bleu de Nil. Mais, si le matériel n'est pas fixé (Elftman, 1958), le noir soudan B colore dans l'hélice principale un chapelet de grains (Pl. IV, fig. d).

B. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Après action du mélange de Keilig, la morphologie est mal conservée. On peut voir cependant (Pl. IV, fig. b) que l'ensemble du matériel de la pièce intermédiaire subsiste, notamment le cristal. On note un vide dans l'hélice principale, à la place occupée originellement par le glycogène.

TABLEAU II : LIPIDES

RÉACTION	MÉTHODE	FIXATEUR	RÉSULTATS ET OBSERVATIONS
— Noir soudan B	C, F	F-cal Da Fano	— pas de coloration de la pièce intermédiaire
— Noir soudan B après postchromisation	C	F-cal	—
— Noir soudan B après démasquage (Ackerman, 1952)	C	F-cal	—
— Noir soudan B	F	non fixé	+ coloration discontinue de l'hélice principale
— Noir soudan B à l'alcool butylique tertiaire (Lison, 1960)	F	F-cal	— pas de coloration de la pièce intermédiaire
— Test de Baker (1946)			
a) coloration par l'hématéine-acide	C	F-cal	forte coloration de l'ensemble de la pièce intermédiaire
b) coloration par l'hématéine-acide après action de la pyridine	C	B	+ la pièce intermédiaire reste colorée
— Coloration par l'hématoxyline de Kultschitzky : réaction de Smith-Dietrich (Dietrich, 1910; Smith et coll., 1909, 1911)	C	F-cal	+ coloration de l'ensemble de la pièce intermédiaire
— Coloration par le sulfate de bleu de Nil (Lison, 1960)	C	F-cal	— pas de coloration de la pièce intermédiaire

Méthodes : F, frottis; C, coupes à congélation.
Fixateurs : F-cal, formol-calcium; B, Bouin.

DISCUSSION

D'une façon générale, les réactifs des lipides (colorants liposolubles), ne colorent pas la pièce intermédiaire (Tableau II), et tendent donc à montrer que la pièce intermédiaire ne renferme pas de lipides décelables par les méthodes histochimiques classiques. Cependant, l'hématéine acide réagit fortement avec l'ensemble de la pièce intermédiaire, mais il ne semble pas que la coloration soit due à des lipides, puisqu'elle persiste après action de la pyridine. Le noir soudan B, à condition de le faire agir sur du matériel non fixé (Elftman, 1958), colore également certaines portions de l'hélice principale (Pl. IV, fig. d). Le nombre, la répartition et la taille des éléments colorés correspondent à ceux des enroulements membraneux de type myélinique localisés dans l'angle externe de l'hélice principale (Pl. IV, fig. c). La délipidation par le mélange de Keilig confirme ces résultats, puisqu'en dehors du vide de l'hélice principale, l'ensemble du matériel de la pièce intermédiaire, notamment le cristal, est conservé (Pl. IV, fig. b).

Cette série de réactions montre qu'à part les enroulements membraneux de l'hélice principale, il n'y a pas de concentration importante de lipides dans la pièce intermédiaire. Le cristal, en particulier, n'est pas de nature lipidique.

Par contre, le cristal et les hélices secondaires sont positifs à divers réactifs des protéines (Pl. I) et digestibles par diverses protéases (Pl. II et III). Ces résultats indiquent la nature protéique du cristal et de la majeure partie des hélices. Comme le montrent la réaction de Chèvremont et Frédéricq et celle au DDD, ces protéines sont riches en radicaux sulfhydrilés. Les réactions à l'acroléine-Schiff et au dinitrofluorobenzène confirment la présence de ces radicaux et révèlent en plus l'existence de fonctions amines libres. Ce sont ces groupements que l'on met en évidence par le réactif de Schiff après traitement par la ninhydrine.

La coloration par le fast-green à pH 8,1 (Pl. I, fig. c et d) indique qu'une partie de ces protéines sont basiques. Cette coloration n'apparaît qu'après traitement par l'acide trichloracétique dont l'action pourrait libérer des groupes polaires amines, jusqu'ici inaccessibles au colorant, par un phénomène analogue à celui connu pour le démasquage des groupes SH ou pour la mise en évidence des histones.

Les protéines du cristal sont sensibles à la pepsine (Pl. III) et résistantes à la trypsine (Pl. II, fig. b et d). Ce fait est à souligner car c'est ainsi que se comportent les mitochondries des tissus soumis aux diges-

tions protéolytiques en coupes ultrafines (Leduc et Bernhard, 1961). Il y a donc, sous le rapport de la sensibilité aux protéases, une parenté entre les protéines des mitochondries banales, ou tout au moins la majorité d'entre elles, et celles qui constituent le cristal de la Testacelle, en dépit d'un arrangement structural très différent. Il y a tout lieu de penser que ce sont ces protéines qui restent colorées par l'hématéine acide après extraction par la pyridine.

Il est généralement considéré que les enzymes de la chaîne respiratoire des mitochondries banales font partie intégrante des crêtes et du feuillet interne de l'enveloppe; selon Lehninger (1964) elles représenteraient environ 25 % du contenu protéinique mitochondrial. Chez la Testacelle, la morphologie est toute différente: il n'y a plus de crêtes, il ne subsiste de l'enveloppe que le feuillet externe et il existe une structure nouvelle, d'arrangement cristallin. L'étude cytochimique nous a montré la nature protéique du cristal. Les déductions d'André (1962), essentiellement fondées sur des données morphologiques, sont ainsi vérifiées. Il est raisonnable de penser que ces protéines sont douées de propriétés enzymatiques puisque le cristal « tire son origine d'un remaniement des molécules engagées dans les crêtes et le feuillet interne de l'enveloppe » (André, 1962). La nature basique d'une partie au moins de ces protéines est en accord avec cette hypothèse, le cytochrome c ayant un point isoélectrique basique.

L'établissement de la nature protéique du cristal renforce d'une parenté cytochimique la ressemblance de forme et de dimension signalée par André (1962, et sous presse) entre les éléments constitutifs du cristal et les particules mises en évidence par diverses techniques sur les crêtes et le feuillet interne de l'enveloppe: « elementary particles » de Fernández-Morán (1962, 1964), « inner membrane subunits » de Parsons (1963). Cette ressemblance est particulièrement visible après action de la trypsine. En dilacérant légèrement le cristal, cette enzyme met en évidence (Pl. II, fig. b et d) des globules de 95 Å de diamètre réunis en files par de courts pédicules. Les globules ont un centre clair de 30 Å de diamètre. Ces éléments peuvent s'interpréter comme des particules élémentaires qui auraient perdu leur base; les globules correspondraient aux têtes des particules élémentaires, et les pédicules les réunissant correspondraient aux tiges.

Dans l'hypothèse selon laquelle il y aurait identité entre les particules élémentaires et les éléments du cristal, l'apparition de particules de morphologie voisine de celle des particules élémentaires peut-être rapprochée de l'opinion de certains auteurs pour qui les particules élémentaires apparaissent à la suite des réassociations moléculaires appliquées aux mitochondries (Sjöstrand et coll., 1964). Mais le phénomène se produit ici spontanément, sans intervention de l'expérimenta-

teur. Il tend donc à faire considérer les particules élémentaires comme une réalité structurale et biochimique, même si les mitochondries banales ne les montrent d'ordinaire pas après les techniques courantes.

Remerciements

Je remercie vivement le Docteur Bernhard qui a eu la bonté de m'accueillir dans son laboratoire de l'Institut de Recherches sur le Cancer, à Villejuif, où la partie microscopie électronique de ce travail a été faite.

Je suis reconnaissant au Professeur André pour ses précieux conseils et la part active qu'il a prise à ce travail.

RÉSUMÉ

L'étude cytochimique du dérivé mitochondrial du spermatozoïde de la *Testacella* montre que le cristal et le contenu des hélices secondaires sont de nature protéique et qu'en dehors d'enroulements membraneux situés dans l'hélice principale, il n'y a pas de concentration importante de lipides dans la pièce intermédiaire.

L'hypothèse d'une identité entre les nœuds du réseau cristallin et les particules élémentaires est envisagée.

SUMMARY

The cytochemical study of the mitochondrial complex of the *Testacella* sperm-cell indicates that the crystal and the content of the helices are proteinaceous, and that, apart from the membranous scroll in the principal helix, there is no lipid in the midpiece.

The hypothesis of an identity between the globules of the crystal and the « elementary particles » is envisaged.

BIBLIOGRAPHIE

1. ACKERMAN G.A., 1952. A modification of the sudan black B technique for the possible cytochemical demonstration of masked lipids. *Science*, 115, 629-631.

2. ALFERT M. et GESCHWIND I., 1953. A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei. *Proc. Nation. Acad. Sci.*, **39**, 991-999.
3. ANDRÉ J., 1962. Contribution à la connaissance du chondriome. Etude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogénèse. *J. Ultrastructure Res., Suppl.* **3**, 1-185.
4. ANDRÉ J., 1965. Quelques données récentes sur la structure et la physiologie des mitochondries : glycogène, particules élémentaires, acides nucléiques. *Arch. Biologie* (sous presse).
5. BACQ Z.M., CHÈVREMONT M. et FRÉDÉRICQ J., 1943. Une nouvelle méthode histochimique de détection des groupes sulfhydriles. *Acta Biol. Belg.*, **3**, 62-64.
6. BAKER J.R., 1946. The histochemical recognition of lipine. *Quart. J. micr. Sci.*, **87**, 441.
7. BARNETT R.J. et SELIGMAN A.M., 1952. Demonstration of protein bound sulfhydryl and disulfide groups by two new histochemical methods. *J. Nat. Cancer Inst.*, **13**, 215-216.
8. BENSLEY R.R. et GERSH L., 1933. Studies on cell structure by the Freezing-Drying method. II. The nature of the mitochondria in the hepatic cell of amblyostoma. *Anat. Rec.*, **57**, 217-237.
9. BONHAG P.F., 1955. Histochemical studies of the ovarian nurse tissues and oocytes of the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Dallas). *J. Morphol.*, **96**, 381-438.
10. BURSTONE M.S., 1955. An evaluation of histochemical methods for protein group. *J. Histochem. Cytochem.*, **3**, 32-49.
11. BURSTONE M.S., 1959. Histochemical methods for Protein Detection. *Handbuch der Histochemie*, Band III, zweiter Teil. W. Graumann et K. Neumann ed., G. Fischer Verlag, Stuttgart.
12. CIACCIO C., 1926. Sur la distribution des lipoïdes histogènes (histo-lipoïdes) dans la cellule. *C.R. Ass. Anat.*, **21**, 160.
13. DANIELLI J.F., 1947. A study of techniques for the cytochemical demonstration of nucleic acid and some components of proteins. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **1**, 101.
14. DANIELLI J.F., 1948. Studies on the cytochemistry of proteins. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **14**, 32.
15. DIETRICH A., 1910. Zur Differenzialdiagnose der Fettsubstanzen. *Verh. dtsch. path. Ges.*, **14**, 263.
16. ELFTMAN H., 1958. Effects of fixation in lipid histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, **6**, 317-321.

17. FERNÁNDEZ-MORAN H., 1962. Molecular organization of cell membranes. *Circulation*, **26**, 1039.
18. FERNÁNDEZ-MORAN H., ODA T., BLAIR P.V. et GREEN D.E., 1964. A macromolecular repeating unit of mitochondrial structure and function. Correlated electron microscopic and biochemical studies of isolated mitochondrial and submitochondrial particles of beef heart muscle. *J. Cell Biol.*, **32**, 63-100.
19. GRASSÉ P.P., CARASSO N. et FAVARD P., 1956. Les ultrastructures cellulaires au cours de la spermiogénèse de l'Escargot (*Helix pomatia* L.) : évolution des chromosomes, du chondriome, de l'appareil de Golgi, etc. *Ann. Sci. Nat. Zool.*, 11^e série, 339-380.
20. IDELMAN S., 1964. Action du méthanol-chloroforme sur les liposomes des cellules cortico-surrénales. *C.R. Acad. Sc.*, **257**, 297-298.
21. KARNOVSKY M., 1961. Simple methods for « staining with lead » at high pH in electron microscopy. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, **11**, 729-732.
22. KEILIG I., 1944. Ueber Spezifitätsbreite und Grundlagen der Markscheidensfärbungen. *Virchows Arch.*, **312**, 405-420.
23. LEDUC E.H. et BERNHARD W., 1961. Ultrastructural cytochemistry. Enzyme and acid hydrolysis of nucleic acids and protein. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, **10**, 437-455.
24. LEDUC E.H., MARINOZZI V. et BERNHARD W., 1963. The use of water-soluble glycolmethacrylate in ultrastructural cytochemistry. *J. Roy. Microsc. Soc.*, **81**, 119-130.
25. LEHNINGER A.L., 1964. The mitochondrion. W.A. Benjamin, Inc., New York.
26. LILLIE R.D., 1958. Acetylation and nitrosation of tissue amines in histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, **6**, 352-362.
27. LISON L., 1960. Histochimie et cytochimie animales. Gauthier-Villars, Paris.
28. LUFT J., 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, **9**, 409-414.
29. MILLONIG G., 1961. Advantages of a phosphate buffer for OsO₄ solutions in fixation. *J. Appl. Phys.*, **32**, 1937.
30. PARSONS D.F., 1963. Mitochondrial structure: two types of subunits on negatively stained mitochondrial membranes. *Science*, **140**, 985-987.
31. PERSONNE P. et ANDRÉ J., 1964. Existence de glycogène mitochondrial dans le spermatozoïde de la Testacelle. *J. Microscopie*, **3**, 643-650.

32. SJÖSTRAND F.S., ANDERSSON-CEDERGREN E. et KARLSSON U., 1964. Myelin figures formed from mitochondrial material. *Nature*, **202**, 1075-1078.
33. SMITH J.L., MAIR W. et THORPE J.F., 1909. An investigation of the principles underlying Weigert's method of staining medullated nerve. *J. Path. Bact.*, **13**, 14.
34. SMITH J.L. et MAIR W., 1911. Further observations on the bi-chromate-hematoxylin method of staining lipoids. *J. Path. Bact.*, **15**, 179.
35. TAHMISIAN T.N., 1964. An orderly domains of particles associated with cytomembranes during spermatogenesis in *Helix aspersa*. *Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, **64**, 25-31.
36. VAN DUIJN P., 1961. Acrolein-Schiff, a new staining method for proteins. *J. Histochem. Cytochem.*, **9**, 234-241.
37. YASUMA A. et ICHIKAWA T.V., 1953. Ninhydrin-Schiff and alloxan-Schiff staining; a new histochemical staining for protein. *J. Lab. Clin. Med.*, **41**, 293.

Manuscrit reçu le 21 juillet 1965.

ABRÉVIATIONS UTILISÉES DANS LES PLANCHES

A, axonème	N, noyau
C, côte	Np, nervure principale
Ci, manchon interne du cristal	Ns, nervure secondaire
Ce, manchon externe du cristal	O, ovocyte
E, enroulements membraneux de l'hélice principale	P, hélice principale
M, membrane externe	S, hélice secondaire

Planche I. — Réactions des protides - Microscopie ordinaire.

Fig. a. — Coloration au bleu de bromophénol mercurique (frottis). La pièce intermédiaire se colore dans son ensemble, les trois hélices étant plus fortement colorées; $\times 2\,000$.

Fig. b. — Réaction à la ninhydrine-Schiff. L'ensemble de la pièce intermédiaire réagit faiblement; $\times 2\,000$.

Fig. c et d. — Colorations par le fast-green alcalin (frottis).

Fig. c. — Coloration par le fast-green alcalin sans prétraitement: la pièce intermédiaire est faiblement colorée; $\times 1\,200$.

Fig. d. — Coloration par le fast-green alcalin après action de l'acide trichloracétique. On note une très forte coloration de l'ensemble de la pièce intermédiaire; $\times 1\,200$.

Fig. e et f. — Réactions acroléine-Schiff.

Fig. e. — Réaction acroléine-Schiff. On observe une forte coloration de l'ensemble de la pièce intermédiaire; $\times 1\,200$.

Fig. f. — Réaction acroléine-Schiff après acétylation. La colorabilité de la pièce intermédiaire est inhibée; $\times 1\,200$.

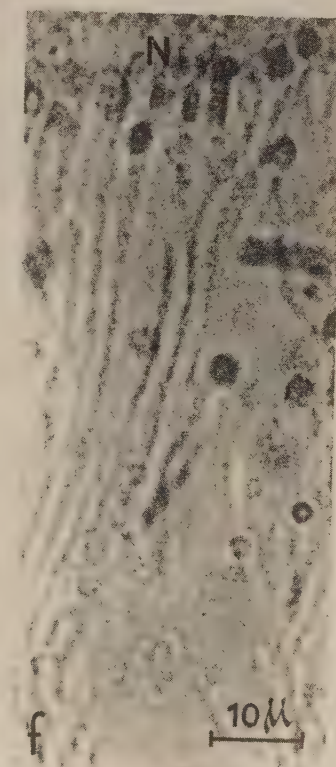
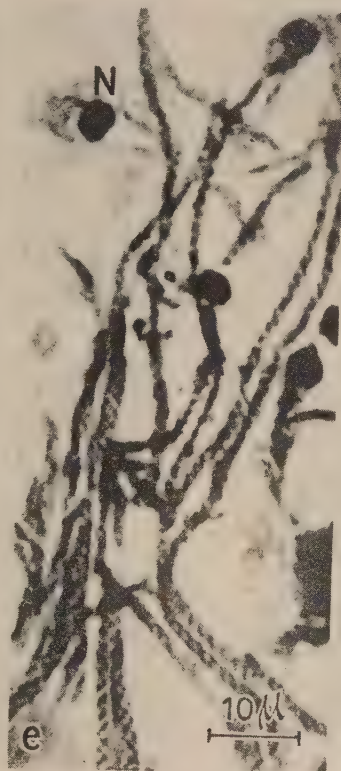
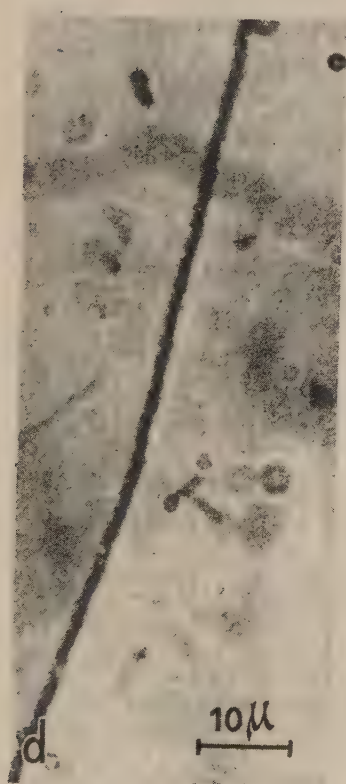
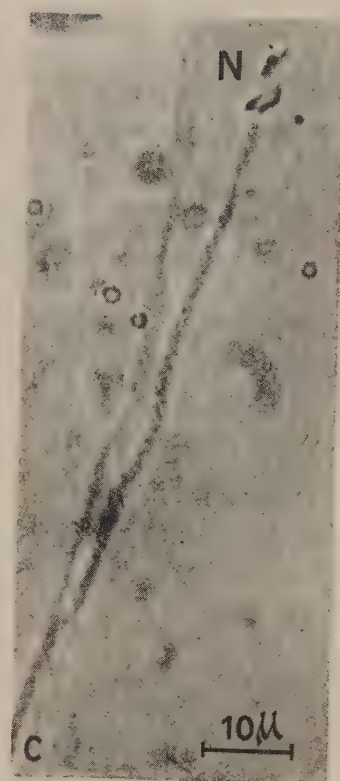


Planche II. — Microscopie électronique. Action des protéases.

Microscopie électronique. Action des protéases.

Fig. a. — Spermatozoïde n'ayant subi aucune action enzymatique; coupe transversale dans la région postérieure de la pièce intermédiaire; $\times 45\ 000$.

Fig. b et d. — Digestion trypsique.

Fig. b. — Coupe transversale dans la région postérieure de la pièce intermédiaire après digestion par la trypsine. La membrane externe a disparu. Les hélices secondaires *S*, très éclaircies, ne possèdent pratiquement plus que leurs membranes limitantes et quelques masses sombres. Dans l'hélice principale *P*, les grains de glycogène sont mieux individualisés, la substance intergranulaire ayant disparu. Le cristal est légèrement dissocié. Ses éléments constitutifs, un peu plus écartés les uns des autres, sont bien visibles (*flèche*); $\times 45\ 000$.

Fig. d. — Incidence de coupe montrant les globules de $95\ \text{\AA}$ de diamètre reliés en files les uns aux autres par de courts pédicules (*cercle*). *G*, glycogène; $\times 120\ 000$. (*L'échelle de cette figure est à inverser avec celle de la fig. c.*)

Fig. c. — Digestion par la pan-protéase. Coupe transversale de la région postérieure de la pièce intermédiaire. On observe que le contenu des hélices a disparu, à part quelques granules dans l'hélice principale. Le cristal est fortement attaqué et a partiellement disparu. Les files de globules subsistent sous la forme de fins filaments (*flèche*). Cette dislocation s'accompagne d'une importante dilatation de la pièce intermédiaire; $\times 45\ 000$.

Fig. e. — Digestion par la papaine. Coupe transversale dans la région postérieure de la pièce intermédiaire. Le cristal a complètement disparu : il ne reste de la pièce intermédiaire que des feuillets membraneux entourant l'axonème; $\times 45\ 000$.

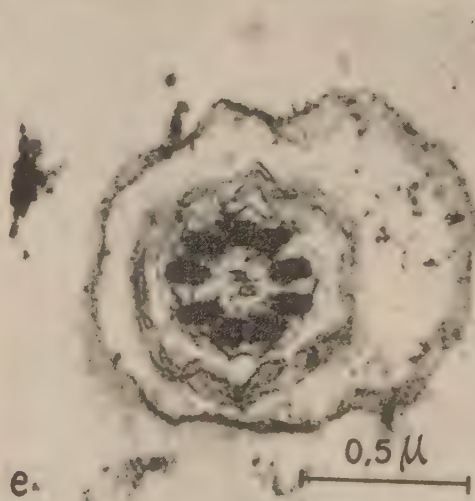
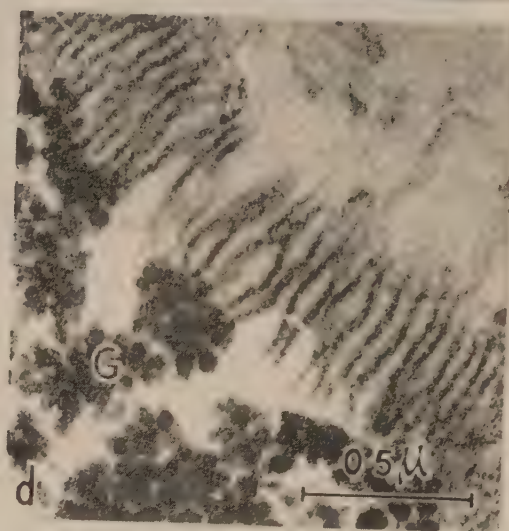
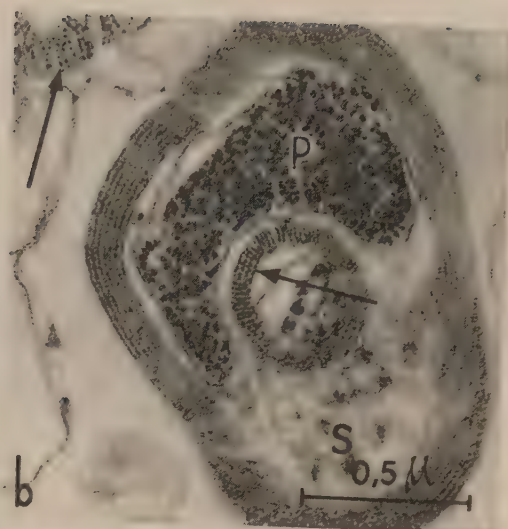


Planche III. — Microscopie électronique. Action de la pepsine.

Fig. a. — Coupes obliques de pièces intermédiaires de spermatozoïdes d'escargot. Certains spermatozoïdes encore presque intacts (*flèche double*), voisinent avec des spermatozoïdes fortement dégradés (*flèches simples*); $\times 45\ 000$.

Fig. b et c. — Action de la pepsine sur coupes après inclusion dans le glycol-méthacrylate.

Fig. b. — Coupe flottée sur la solution d'enzyme. On observe la disparition presque complète du cristal et une dilatation de la pièce intermédiaire; $\times 45\ 000$.

Fig. c. — Témoin (coupe flottée sur le solvant de l'enzyme). Le cristal est encore présent; $\times 45\ 000$.

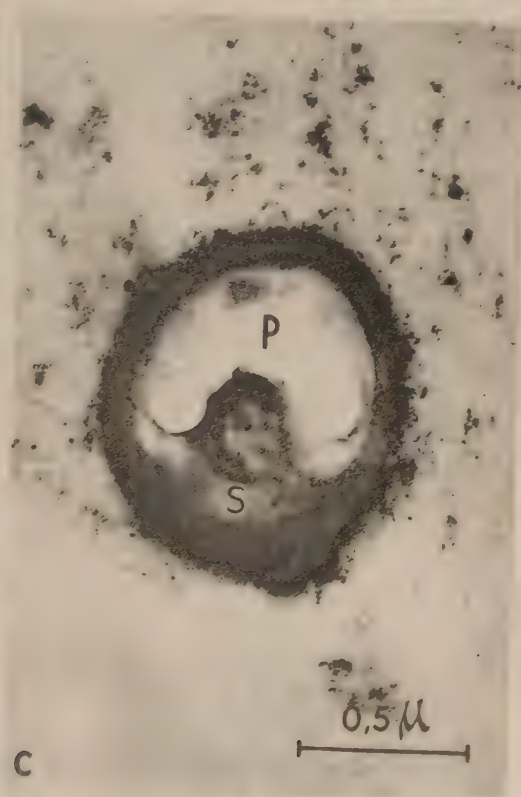
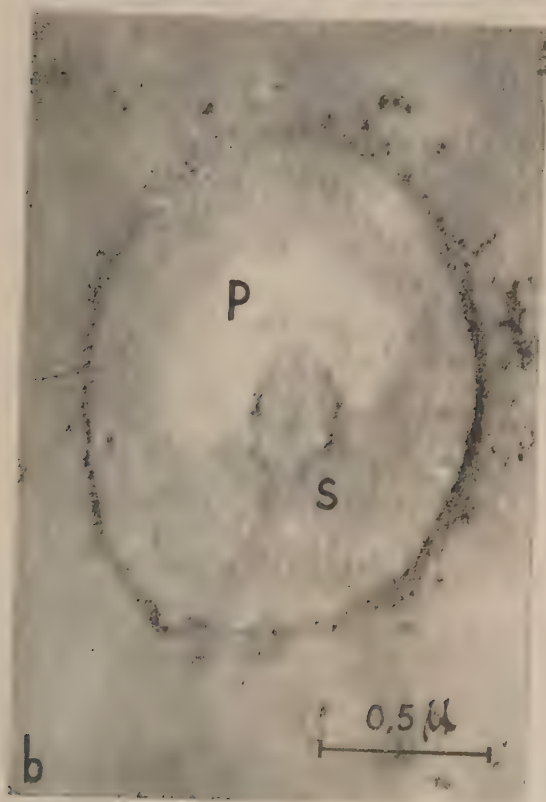
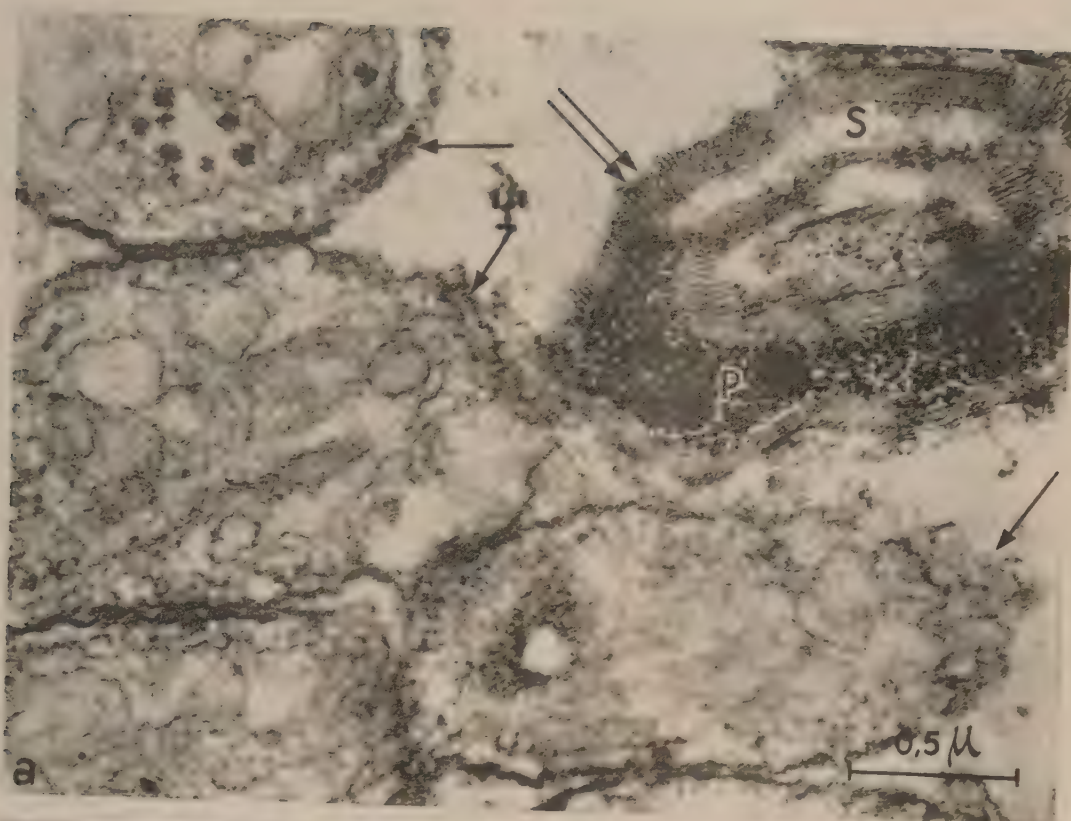


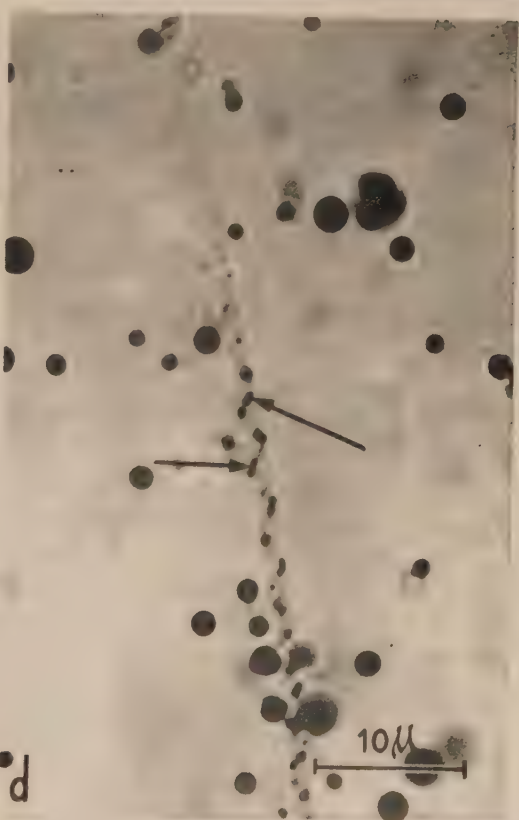
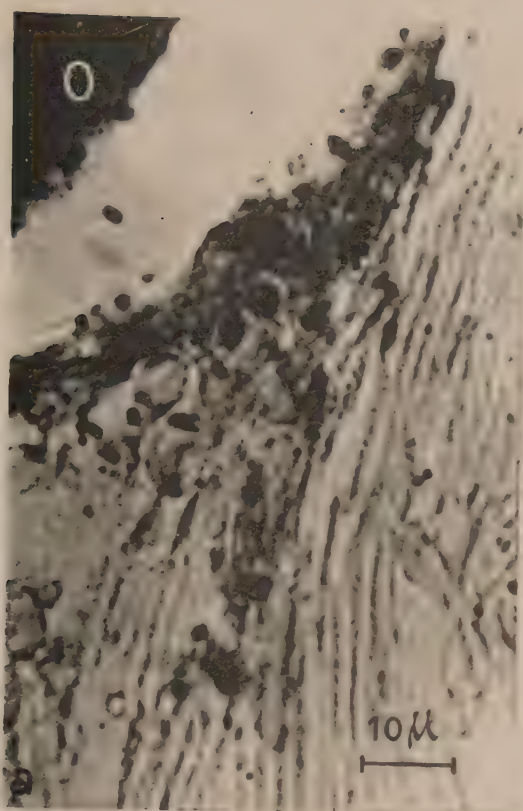
Planche IV. — Recherche des lipides.

Fig. a. — Coloration au noir soudan B sur des coupes à congélation de matériel fixé au formol-calcium. On n'observe pas de coloration de la pièce intermédiaire. L'ovocyte *O* est fortement coloré; $\times 1\ 200$.

Fig. b. — Microscopie électronique. Coupe oblique d'une pièce intermédiaire après traitement par le méthanol-chloroforme de Keilig. On reconnaît l'axonème *A* et le cristal, qui est toujours présent (*flèche*). On observe la disparition du contenu de l'hélice principale *P*; $\times 45\ 000$.

Fig. c. — Ultrastructure : fixation osmique, coloration à l'acétate d'uranyle, inclusion au méthacrylate. (Cliché dû à l'obligeance du Dr André). Coupe presque longitudinale de la portion antérieure de la pièce intermédiaire. On voit les deux manchons cristallins : le manchon interne périflagellaire (*flèche simple*) et le manchon externe (*flèche double*). Entre eux se trouvent les hélices : *S*, hélices secondaires et *P*, hélice principale. L'angle externe de l'hélice principale est occupé par des enroulements de membranes (*cercles*); $\times 45\ 000$.

Fig. d. — Coloration au noir soudan B d'un frottis non fixé. On observe une coloration de répartition longitudinale discontinue sur l'hélice principale (*flèche*). Sur le fond, nombreuses gouttelettes lipidiques libérées par les cellules nourricières et les ovocytes lors de la mise en frottis; $\times 2\ 000$.



COMPARTIMENTAGE DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DANS LE SPERMATOZOÏDE DE CERTAINS MOLLUSQUES GASTÉROPODES

I. LOCALISATION DES DÉSHYDROGÉNASES

P. PERSONNE* ET W. ANDERSON†

Laboratoire de Biologie Animale, Faculté des Sciences, 80-Amiens
et Laboratoire de Biologie Cellulaire 4, Faculté des Sciences, 91-Orsay, France

RÉSUMÉ

Les activités succinate tétrazolium réductasique et NADH_2 tétrazolium réductasique ont été mises en évidence à l'aide de la cytochimie ultrastructurale dans les spermatozoïdes de quelques Gastéropodes Pulmonés, Testacelle et Escargot. Ces activités enzymatiques se localisent dans un espace fort restreint du dérivé mitochondrial, l'hélice secondaire, qui correspond à ce qui subsiste de la matrice des mitochondries originelles. La 'métamorphose' mitochondriale a abouti à une ségrégation des activités déshydrogénasiques dans une portion spécialisée du dérivé mitochondrial, le compartiment matriciel.

SUMMARY

By electron-microscope cytochemistry, succinate- and NADH_2 -tetrazolium reductase activities have been demonstrated in spermatozoa of the pulmonate gastropods, *Testacella* and *Helix*. Enzyme reaction product is restricted to the mitochondrial compartment named the secondary helix; this compartment is derived from the matrix of typical mitochondria. 'Mitochondrial metamorphosis' during spermiogenesis accomplishes the segregation of dehydrogenases to this matrical compartment.

INTRODUCTION

Chez les Gastéropodes Pulmonés, une architecture mitochondriale nouvelle s'organise dans le spermatozoïde (Grassé, Carasso & Favard, 1956; André, 1962; Tahmisian, 1964; Personne & Anderson, en préparation). Elle aboutit à la formation de la pièce intermédiaire du spermatozoïde. Elle résulte de la fusion, de la condensation puis d'une 'métamorphose' du matériel mitochondrial dont la majeure partie s'organise en un cristal (André, 1962) de nature protéique (Personne, 1965). Ce cristal est creusé de canaux hélicoïdaux dont le plus volumineux, dit hélice principale, contient une importante quantité de glycogène (Personne & André, 1964; André, 1965). Les autres, dits hélices secondaires, renferment un matériel dense de nature protéique (Personne, 1965).

* Cette publication fait partie d'une thèse de Doctorat d'État ès Sciences Naturelles devant être soutenue à la Faculté des Sciences d'Orsay.

† Boursier de l'American Cancer Society (PF. n° 342).

Il nous a paru intéressant de rechercher si des dérivés mitochondriaux tellement transformés présentaient des modifications de leur équipement enzymatique.

Nous avons précédemment montré l'existence, dans la pièce intermédiaire, d'activités enzymatiques jusqu'alors inconnues dans les mitochondries: la membrane limitant l'hélice secondaire possède une activité glucose 6-phosphatase (Anderson, Personne & André, 1968), et une activité phosphorylasique est présente dans le compartiment à glycogène (Personne, 1966; Personne & Anderson, 1969). D'autres phosphatases: phosphatase acide, ATPase sont localisées dans le flagelle (Anderson *et al.* 1968). Par voie spectrophotométrique, C. Ritter & J. André (communication personnelle) ont montré la présence de plusieurs des éléments de la chaîne des transporteurs d'électrons sous une forme active.

Barnett (1959, 1960), Edwards & Valentine (1963), Ogawa & Barnett (1965), Ogawa & Saito (1963) et Sedar, Rosa & Tsou (1962) ont montré que les formazans étaient suffisamment opaques aux électrons pour être visualisés au microscope électronique. Ces formazans révèlent l'existence de quelques activités tétrazolium reductasiques dans le métabolisme respiratoire. Dans ce travail, nous avons cherché à mettre en évidence par les méthodes cytochimiques, puis à localiser à l'échelle ultrastructurale, les activités déshydrogénasiques des mitochondries et principalement du cycle tricarboxylique.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Nous utilisons les espèces *Testacella haliotide* (Drap.) et *Helix aspersa* (Müller).

Milieux d'incubation

Pour la succinate tétrazolium réductase. Cinq ml de succinate de sodium 0.1 M dans un tampon phosphate 0.1 M au pH 7.4; 5 ml de NBT (Nachlas *et al.* 1957), de TNBT (Sedar *et al.* 1962) ou de TC-NBT (Seligman *et al.* 1967), à 0.1 % dans l'eau distillée; 0.75 g de sucrose.

Le milieu témoin est dépourvu de succinate ou contient 75 mg de malonate de sodium par ml.

Pour l' α -glycérophosphate tétrazolium réductase. 0.1 ml d' α -glycérophosphate de sodium, 0.1 M; 0.1 ml de $MgSO_4$, 0.005 M; 0.25 ml de tampon phosphate, 0.1 M au pH 7.4; 0.25 ml de NBT, de TNBT ou de TC-NBT, à 0.4 % dans l'eau distillée; 0.3 ml d'eau distillée; 0.075 g de sucrose.

Le milieu témoin est dépourvu d' α -glycérophosphate.

Pour les tétrazolium réductases liées au NAD. Milieu de Hess, Scarfelli & Pearse (1958) modifié: 0.1 ml de substrat; 0.1 ml de NAD à 0.3 % dans l'eau distillée; 0.1 ml de $MgSO_4$, 0.005 M; 0.25 ml de tampon phosphate, 0.1 M au pH 7.4; 0.25 ml de NBT, de TNBT ou de TC-NBT, à 0.4 % dans l'eau distillée; 0.2 ml d'eau distillée; 0.075 g de sucrose. Les substrats suivants ont été utilisés: acide L-malique, acide DL-isocitrique, acide α -cétoglutarique, acide β -hydroxybutyrique.

Les préparations témoin sont incubées dans un milieu dépourvu de substrat.

Pour la $NADH_2$ tétrazolium réductase. Milieu de Seligman *et al.* (1967): 5 ml de

tampon phosphate, 0.1 M au pH 7.4; 5 ml de TC-NBT à 0.1 % dans l'eau distillée; 5 mg de NADH₂; 0.75 g de sucrose.

Le milieu témoin est dépourvu de NADH₂.

Mode opératoire

Le canal hermaphrodite, écrasé légèrement entre lame et lamelle, libère un liquide spermatique riche en spermatozoïdes mûrs. Une petite quantité de ce liquide est mise en suspension dans l'un des milieux décrits ci-dessus, maintenu à l'étuve à 37 °C pendant 15 à 30 min. Une fois l'incubation terminée, on centrifuge légèrement et on élimine le surnageant. Le culot est resuspendu pendant 5 min dans un tampon phosphate 0.1 M au pH 7.4 contenant du sucrose 0.22 M, puis centrifugé.

Une fraction du culot placée entre lame et lamelle est examinée au microscope ordinaire. Le reste est préparé pour la microscopie électronique.

Manipulation des culots pour la microscopie électronique

Différentes fixations ont été pratiquées.

(1) Glutaraldéhyde seule pendant 2 h à 20 °C. La solution suivante (Anderson, Weissman & Ellis, 1967) a été utilisée: 8 ml de glutaraldéhyde 2.5 %; 1.5 g de sucrose; 50 ml de cacodylate de sodium, 0.1 M; 42 ml d'eau distillée. Après fixation les culots sont lavés rapidement dans du cacodylate de sodium 0.1 M contenant du sucrose, 0.15 M.

(2) Tetroxyde d'osmium à 2 % dans un tampon phosphate, 0.1 M au pH 7.3 pendant 1 à 2 h à la température ordinaire.

Dans le cas où l'on utilise comme tétrazolium le TC-NBT, la fixation est faite à 50 °C et la solution n'est pas tamponnée.

(3) Glutaraldéhyde comme indiqué ci-dessus (Anderson *et al.* 1967) 1 h à 20 °C, suivie après un bref lavage dans le cacodylate de sodium-sucrose, d'une postosmication, pendant 1 h 30 m à 20 °C, dans une solution de tetroxyde d'osmium à 2 % dans l'eau distillée.

Dans le cas où le sel de tétrazolium est le TC-NBT (Seligman *et al.* 1967), cette postosmication est faite à 50 °C.

Après fixation, les culots sont déshydratés par l'acétone. L'inclusion est pratiquée dans un mélange d'Araldite et d'Epon (Voelz & Dworkin, 1962; Anderson & Ellis, 1965). Ce milieu possède l'avantage d'être dépourvu de MNA (méthyl nadic anhydride), Ogawa & Barrnett (1965) ayant signalé la solubilité de certains formazans dans ce dernier constituant.

OBSERVATIONS

Succinate tétrazolium réductase et α -glycérophosphate tétrazolium réductase

Les spermatozoïdes incubés en présence de succinate ou d' α -glycérophosphate et d'un sel de tétrazolium réagissent fortement. L'examen au microscope ordinaire montre une forte coloration dans la pièce intermédiaire. Chez les spermatozoïdes

d'Escargot, il est difficile de préciser la localisation du formazan. Chez les spermatozoïdes de la Testacelle, deux hélices sont colorées (Fig. 11): ce sont les hélices secondaires (André, 1962). La coloration est bleu violacé lorsqu'on utilise le NBT ou le TC-NBT, bleu foncé lorsque l'on utilise le TNBT. Nous n'avons pas observé de formazan sur les spermatozoïdes incubés en l'absence de substrat. Le malonate de sodium ajouté dans le milieu d'incubation au succinate inhibe la formation du formazan.

Sur les spermatozoïdes incubés en présence de succinate et de NBT ou de TNBT, puis fixés par la glutaraldéhyde seule (Figs. 1, 5) ou par la glutaraldéhyde suivie du tetroxyde d'osmium (Figs. 2, 6), les dépôts de formazan sont visibles au microscope électronique. Ils sont beaucoup plus visibles après une simple fixation par la glutaraldéhyde (Figs. 1, 5). Nous ne les avons observés que très rarement après fixation par le tetroxyde d'osmium seul. Ils sont localisés dans une portion bien définie de la pièce intermédiaire, celle qui correspond à l'hélice secondaire (André, 1962; Personne & Anderson, en préparation). Le NBT donne un formazan qui se présente sous l'aspect de cristaux assez volumineux: 600 à 800 Å (Fig. 1). Le TNBT donne des dépôts plus fins, le plus souvent d'apparence non cristallins aux grossissements que nous avons employés (Fig. 5).

Dans les spermatozoïdes incubés dans le milieu au succinate TC-NBT, le formazan formé, qui est osmiophile, réagit avec le tetroxyde d'osmium (Seligman *et al.* 1967). Le noir d'osmium produit se localise également sur l'hélice secondaire. Dans ce cas, les dépôts sont extrêmement fins et les structures cellulaires contrastées par l'acide osmique sont mieux visibles (Figs. 8, 9, 12 et 14).

Aucun dépôt de formazan ou de noir d'osmium n'est décelable sur les spermatozoïdes incubés sans succinate (Figs. 3, 4, 7).

NADH₂ tétrazolum réductase

Pour rechercher cette activité enzymatique, nous avons utilisé uniquement la méthode de Seligman *et al.* (1967) au TC-NBT. Au microscope ordinaire, nous observons que la pièce intermédiaire des spermatozoïdes d'Escargot incubés en présence de NADH₂ et de TC-NBT se colore en bleu violacé. Au microscope électronique on voit un dépôt de noir d'osmium au niveau de l'hélice secondaire (Figs. 10, 13, 15). En l'absence de NADH₂, aucune formation de formazan n'est décelable au microscope ordinaire ni au microscope électronique.

Tétrazolum réductases liées au NAD

En présence de NAD et de l'un des substrats suivants, acide β -hydroxybutyrique, acide DL-isocitrique, acide α -cétoglutarique, acide L-malique, la pièce intermédiaire du spermatozoïde de l'Escargot réduit le NBT, le TNBT ou le TC-NBT. Au microscope électronique, seule la méthode de Seligman *et al.* (1967) au TC-NBT tetroxyde d'osmium a été utilisée. Le noir d'osmium formé se répartit, comme précédemment, exclusivement sur l'hélice secondaire.

Les préparations témoin, incubées en présence de NAD, mais en l'absence de substrat, ne présentent aucune formation de formazan.

DISCUSSION

En présence d'un substrat convenable, succinate, α -glycérophosphate, NADH_2 , DL-isocitrate + NAD, α -cétoglutarate + NAD, L-malate + NAD, β -hydroxybutyrate + NAD, la pièce intermédiaire des spermatozoïdes des Gastéropodes Pulmonés Testacelle et Escargot est capable de réduire le NBT, le TNBT ou le TC-NBT. Le formazan ne se forme que lorsque le milieu contient le substrat, ce qui permet d'exclure une formation aspécifique du formazan. Le dérivé mitochondrial du spermatozoïde chez ces Gastéropodes possède donc les enzymes ou systèmes enzymatiques capables d'arracher l'hydrogène aux substrats cités précédemment, pour le porter sur le tétrazolium. Ce sont, respectivement, selon Novikoff (1963), les systèmes succinate tétrazolium réductase, α -glycérophosphate tétrazolium réductase, NADH_2 tétrazolium réductase, DL-isocitrate tétrazolium réductase, α -cétoglutarate tétrazolium réductase, L-malate tétrazolium réductase et β -hydroxybutyrate tétrazolium réductase. La méthode cytochimique ne permet la localisation précise que des systèmes succinate tétrazolium réductase et NADH_2 tétrazolium réductase. Pour les autres activités tétrazolium réductasiques liées au NAD, le formazan formé correspond en fait au site de la NADH_2 tétrazolium réductase normalement associée à la déshydrogénase.

La présence de l'activité succino-déshydrogénasique au niveau de la pièce intermédiaire, a déjà été montrée chez divers spermatozoïdes. L'étude biochimique des pièces intermédiaires isolées a permis de la déceler, chez *Patella* et *Ciona* (Restivo & Reverberi, 1957) et chez le Rat (Nelson, 1955). La démonstration cytochimique en a été faite chez le Cobaye (Birns & Masek, 1961), chez le Rat (Nachlas *et al.* 1957), chez la Testacelle (André, 1962) et chez divers Invertébrés (Gupta & Kamboj, 1962). Ces observations, faites au microscope ordinaire, n'ont pas permis de préciser la localisation de l'enzyme. Chez le Lapin, Edwards & Valentine (1963) ont montré, à l'aide du microscope électronique, les dépôts de formazan formés sur la pièce intermédiaire. Examinant des spermatozoïdes entiers, ces auteurs n'ont pas pu fournir de résultats plus précis. Nelson (1959) a cherché à démontrer chez le Rat une localisation au niveau ultrastructural. Ses observations le font conclure à l'existence d'une succino-déshydrogénase extramitochondriale, localisée aux neuf grosses fibres externes du flagelle (coarse fibers).

Nous avons vu chez les Gastéropodes Pulmonés Testacelle et Escargot, une localisation plus sélective. Au microscope électronique, nous n'observons de formazan que sur le contenu de l'hélice secondaire. L'examen supravital de spermatozoïdes incubés dans les mêmes conditions, montre la même répartition du formazan, ce qui permet d'exclure une migration du formazan au cours de la fixation. Dans un travail antérieur (Personne, 1965), nous avons montré la nature protéique du contenu de l'hélice secondaire. Une fausse localisation due à une migration du formazan vers les interfaces eau-lipides n'est donc pas à redouter. Nous savons que le contenu de l'hélice secondaire est ce qui subsiste de la matrice des mitochondries originelles (Personne & Anderson, en préparation). Nos résultats diffèrent de ceux rapportés par Ogawa & Barnett (1965) et par Seligman *et al.* (1967) qui observent un dépôt du formazan sur la membrane interne de mitochondries banales. De même Lehninger (1964) a montré,

par des études biochimiques, que les activités succino-déshydrogénasique et NADH_2 cytochrome *c* réductasique, ainsi que les autres constituants de la chaîne respiratoire, sont localisés sur la membrane interne.

Cette situation exceptionnelle des activités succinate tétrazolium réductasique et NADH_2 tétrazolium réductasique peut s'expliquer par une ségrégation et un compartimentage des constituants de la chaîne respiratoire lors de la 'métamorphose' mitochondriale (André, 1962; Personne & Anderson, en préparation). Chez les Gastéropodes Pulmonés, la morphologie mitochondriale est profondément modifiée. La majeure partie du dérivé mitochondrial est occupée par une structure cristalline constituée de globules de 90 Å morphologiquement semblables (André, 1965; Personne, 1965) à la partie terminale des 'particules élémentaires' décrites par Fernández-Morán (1962) et retrouvées depuis par de nombreux auteurs. La matrice des mitochondries originelles persiste sous la forme d'un mince compartiment limité par ce qui reste de la membrane interne (Personne & Anderson, en préparation): c'est l'hélice secondaire. Ainsi le dérivé mitochondrial résulte de modifications profondes et complexes des mitochondries de la spermatide, véritable 'métamorphose' mitochondriale (André, 1962). Au cours de ces remaniements, une partie du matériel des crêtes se ségrège et se réorganise en compartiments ayant chacun une fonction bien définie. C. Ritter & J. André (communication personnelle) ont observé par spectrophotométrie que la chaîne des cytochromes est présente, sous une forme active. Ces auteurs ont de fortes présomptions pour penser que ces cytochromes sont localisés sur le cristal. L'autre extrémité de la chaîne des transporteurs, succino-déshydrogénase et NADH_2 déshydrogénase, migre dans le compartiment matriciel où se trouvent ainsi concentrées les déshydrogénases mitochondriales et principalement celles du cycle de Krebs. C'est également dans ce compartiment que se trouve la sorbitol déshydrogénase (Anderson & Personne, 1969), enzyme intervenant dans la différenciation et le métabolisme du sperme (Bishop, 1967).

Cette nouvelle organisation mitochondriale s'accompagne de modifications dans la physiologie de ces organites comme le montre l'apparition d'un compartiment à glycogène (Personne & André, 1964; André, 1965) auquel sont associées des enzymes de son métabolisme (Personne & Anderson, 1969; Anderson *et al.* 1968).

Ce travail a bénéficié de l'aide du C.N.R.S. (R.C.P. 21 et L.A. 86) et de la D.R.M.E. (contrat n° 500/67).

TRAVAUX CITÉ

- ANDERSON, W. A. & ELLIS, R. A. (1965). Ultrastructure of *Trypanosoma lewisi*: flagellum, microtubules and the kinetoplast. *J. Protozool.* 12, 483-499.
- ANDERSON, W. A. & PERSONNE, P. (1969). The cytochemical localization of sorbitol dehydrogenase in spermatozoa of *Helix aspersa*. *J. Microscopie* 8, 82-87.
- ANDERSON, W. A., PERSONNE, P. & ANDRÉ, J. (1968). Chemical compartmentalization in *Helix* spermatozoa. *J. Microscopie* 7, 367-390.
- ANDERSON, W. A., WEISSMAN, A. & ELLIS, R. A. (1967). Cytodifferentiation during spermiogenesis in *Lumbricus terrestris*. *J. Cell Biol.* 32, 11-26.
- ANDRÉ, J. (1962). Contribution à la connaissance du chondriome. Étude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogenèse. *J. Ultrastruct. Res.* (Suppl.) 3, 1-185.
- ANDRÉ, J. (1965). Quelques données récentes sur la structure et la physiologie des mitochondries: glycogène, particules élémentaires, acides nucléiques. *Archs Biol.* 76, 277-304.

- BARNETT, R. J. (1959). The demonstration with the electron microscope of the end-products of histochemical reactions in relation to the fine structure. *Expl Cell Res.* (Suppl.) 7, 65-89.
- BARNETT, R. J. (1960). Combination of histochemistry and cytochemistry with electron microscopy for the demonstration of the sites of succinic dehydrogenase activity. *4th Int. Conf. Electron Microsc.*, Berlin, 1958, pp. 91-100. Berlin: Springer.
- BIRNS, M. & MASEK, B. (1961). Localization of enzymes activities in frozen-substituted-fixed cells. *J. Histochem. Cytochem.* 9, 204-206.
- BISHOP, D. W. (1967). Significance of testicular sorbitol dehydrogenase (SDH). *J. gen. Physiol.* 50 (10), 2504.
- EDWARDS, R. G. & VALENTINE, R. C. (1963). Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase in intact rabbit spermatozoa. *Expl Cell Res.* 31, 508-516.
- FERNÁNDEZ-MORÁN, H. (1962). Molecular organization of cell membranes. *Circulation* 26, 1039.
- GRASSÉ, P. P., CARASSO, N. & FAVARD, P. (1956). Les ultrastructures cellulaires au cours de la spermiogénèse de l'Escargot (*Helix pomatia* L.). Evolution des chromosomes, du chondriome, de l'appareil de Golgi, etc. *Annls Sci. nat. Zool.* 11^e série, pp. 339-380.
- GUPTA, B. L. & KAMBOJ, V. P. (1962). Histochemical localization of succinic dehydrogenase activity in the mitochondria of some invertebrate spermatozoa. *Nature, Lond.* 193, 788.
- HESS, R., SCARPELLI, D. G. & PEARSE, A. G. E. (1958). The cytochemical localization of oxidative enzymes. II. Pyridine nucleotide-linked dehydrogenases. *J. biophys. biochem. Cytol.* 4, 753-760.
- LEHNINGER, A. L. (1964). *The Mitochondrion*. New York: Benjamin.
- NACHLAS, M. M., TSOU, K. C., SOUZA, E. DE, CHENG, C. S. & SELIGMAN, A. M. (1957). Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new *p*-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.* 5, 420-436.
- NELSON, L. (1955). Enzyme distribution in fragmented bull spermatozoa. II. Succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase. *Biochim. biophys. Acta* 16, 494-501.
- NELSON, L. (1959). Cytochemical studies with the electron microscope. II. Succinic dehydrogenase in rat spermatozoa. *Expl Cell Res.* 16, 403-410.
- NOVIKOFF, A. B. (1963). Electron transport enzymes: biochemical and tetrazolium staining studies. *First Int. Congr. Histochem. Cytochem.*, pp. 465-481. Oxford: Pergamon.
- OGAWA, K. & BARNETT, R. J. (1965). Electron cytochemical studies of succinic dehydrogenase and dihydronicotinamide-adenine dinucleotide diaphorase activities. *J. Ultrastruct. Res.* 12, 488-508.
- OGAWA, K. & SAITO, Y. (1963). Electron histochemistry of dihydronicotinamide-adenine dinucleotide (NADH₂) diaphorase using tetrazolium salts as H acceptors. *J. Electron Microsc.*, Tokyo, 12, 67-71.
- PERSONNE, P. (1965). Etude cytochimique du dérivé mitochondrial du spermatozoïde de la Testacelle: recherche des protéines et des lipides. *J. Microscopie* 4, 627-642.
- PERSONNE, P. (1966). Rôle des mitochondries dans le métabolisme du glycogène. *J. Microscopie* 5, 70a.
- PERSONNE, P. & ANDERSON, W. A. (1969). Localisation mitochondriale d'enzymes liées au métabolisme du glycogène dans le spermatozoïde de l'Escargot. (In the Press.)
- PERSONNE, P. & ANDRÉ, J. (1964). Existence de glycogène mitochondrial dans le spermatozoïde de la Testacelle. *J. Microscopie* 3, 643-650.
- RESTIVO, F. & REVERBERI, G. (1957). Ricerche sugli spermi di *Ciona* e di *Patella*. Localizzazione della citocromossidasi, della succino-deidrogenasi e del glicogeno. *Acta Embryol. Morph. exp.* 1, 164-170.
- SEDAR, A. W., ROSA, C. G. & TSOU, K. C. (1962) Tetranitro-blue tetrazolium and the electron histochemistry of succinic dehydrogenase. *J. Histochem. Cytochem.* 10, 506-508.
- SELIGMAN, A. M., UENO, H., MORIZONO, Y., WASSERKRUG, H. L., KATZOFF, L. & HANKER, J. B. (1967). Electron microscopic demonstration of dehydrogenase activity with a new osmiophilic ditetrazolium salt (TC-NBT). *J. Histochem. Cytochem.* 15, 1-13.
- TAHMISIAN, T. N. (1964). On orderly domains of particles associated with cytomembranes during spermatogenesis in *Helix aspersa*. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.* 64, 25-31.
- VOELZ, H. & DWORKIN, M. (1962). Fine structure of *Myxococcus xanthus* during morphogenesis. *J. Bact.* 84, 943-952.

(Received 19 August 1968)

Figs. 1-6. Succinate tétrazolium réductase. Coupes transversales de spermatozoïdes d' Escargot.

Fig. 1. Incubation dans le milieu au succinate NBT, fixation glutaraldéhyde seule. Les dépôts de formazan (flèche) se localisent au niveau de l'hélice secondaire. $\times 45\,000$.

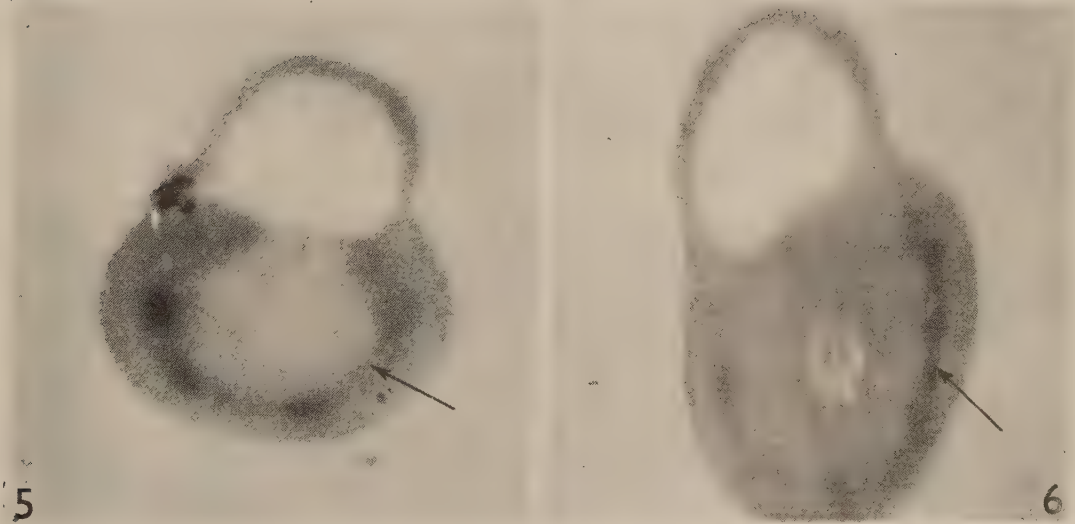
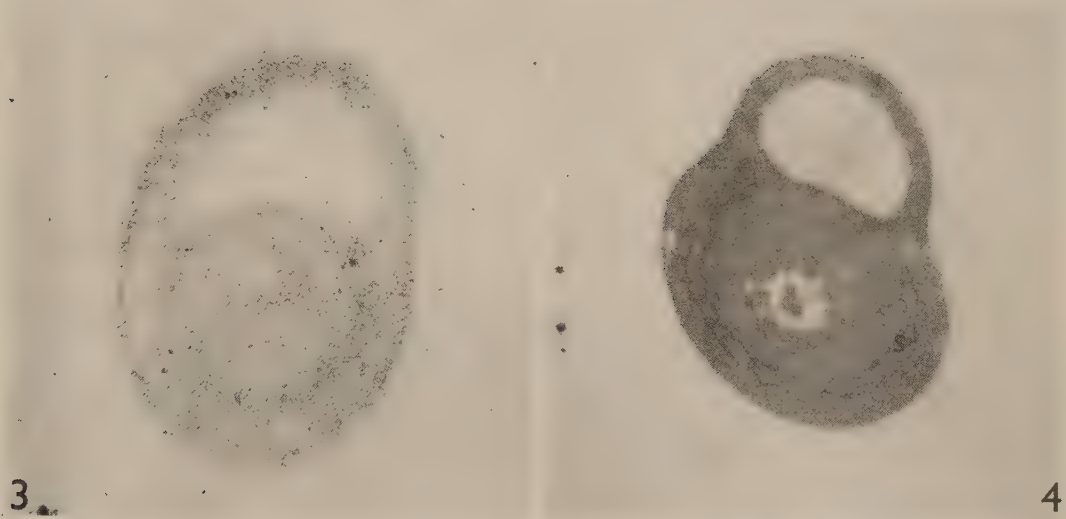
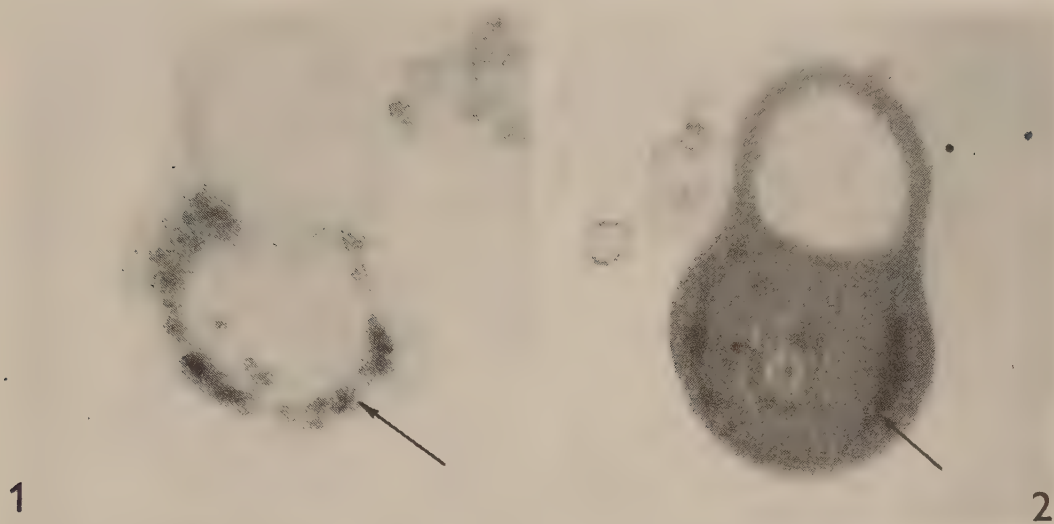
Fig. 2. Incubation dans le milieu au succinate NBT, fixation glutaraldéhyde-tetroxyde d'osmium. Les dépôts de formazan (flèche) se localisent au niveau de l'hélice secondaire. $\times 45\,000$.

Fig. 3. Incubation dans le milieu témoin au NBT en l'absence de succinate, fixation glutaraldéhyde seule. $\times 45\,000$.

Fig. 4. Incubation dans le milieu témoin au NBT en l'absence de succinate, fixation glutaraldéhyde-tetroxyde d'osmium. (s indique l'hélice seondaire.) $\times 45\,000$.

Fig. 5. Incubation dans le milieu au succinate TNBT, fixation glutaraldéhyde seule. Les dépôts de formazan (flèche) se localisent au niveau de l'hélice secondaire. $\times 45\,000$.

Fig. 6. Incubation dans le milieu au succinate TNBT, fixation glutaraldéhyde-tetroxyde d'osmium. Les dépôts de formazan (flèche) se localisent au niveau de l'hélice secondaire. $\times 45\,000$.



Figs. 7-10. Technique de Seligman au TC-NBT tétr oxyde d'osmium.

Fig. 7. Coupes transversales de spermatozoïdes incubés dans le milieu témoin au TC-NBT en l'absence de succinate. $\times 45\,000$.

Fig. 8. Coupes transversales de spermatozoïdes incubés dans le milieu au succinate TC-NBT. Les dépôts de noir d'osmium se localisent au niveau de l'hélice secondaire. $\times 45\,000$.

Fig. 9. Coupe longitudinale de spermatozoïde incubé dans le milieu au succinate TC-NBT. Les dépôts de noir d'osmium se localisent au niveau de l'hélice secondaire. $\times 60\,000$.

Fig. 10. NADH_2 tétrazolium réductase. Coupe longitudinale de spermatozoïde incubé dans le milieu au NADH_2 TC-NBT. Le dépôt de noir d'osmium se localise sur l'hélice secondaire. $\times 60\,000$.

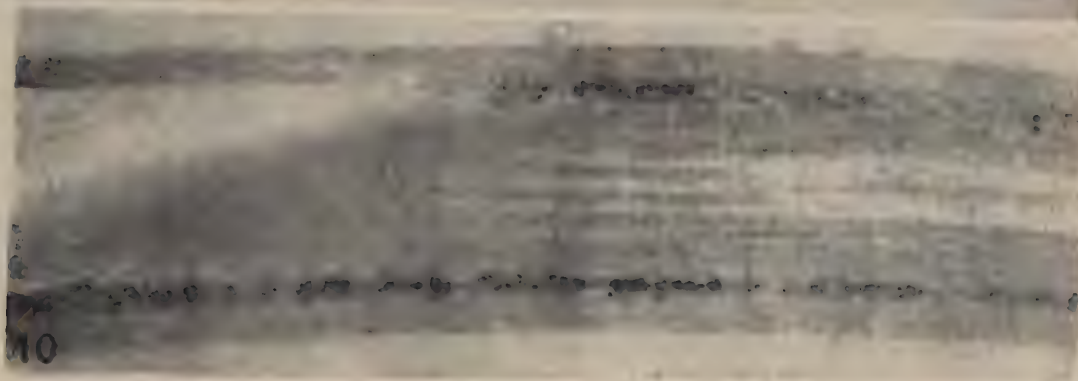
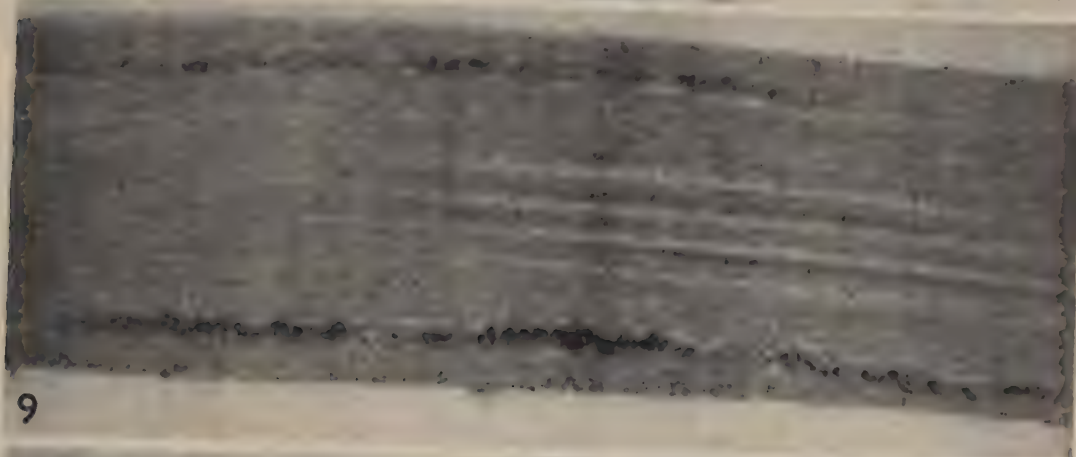
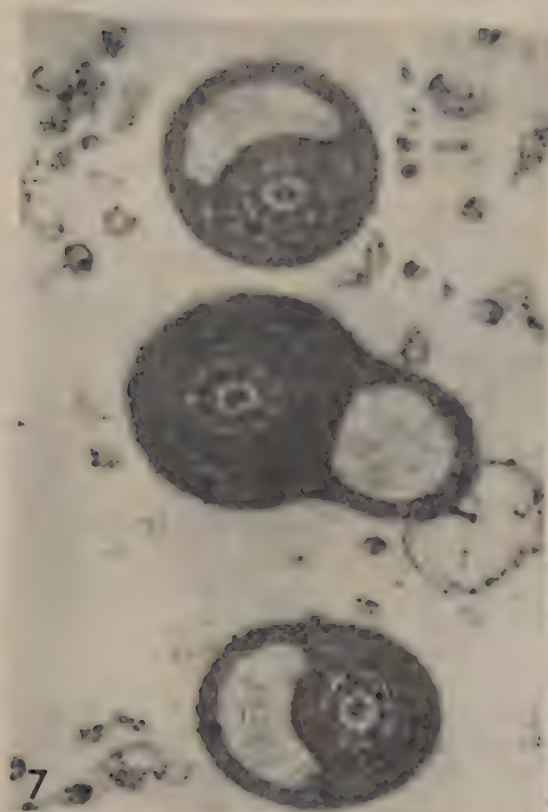
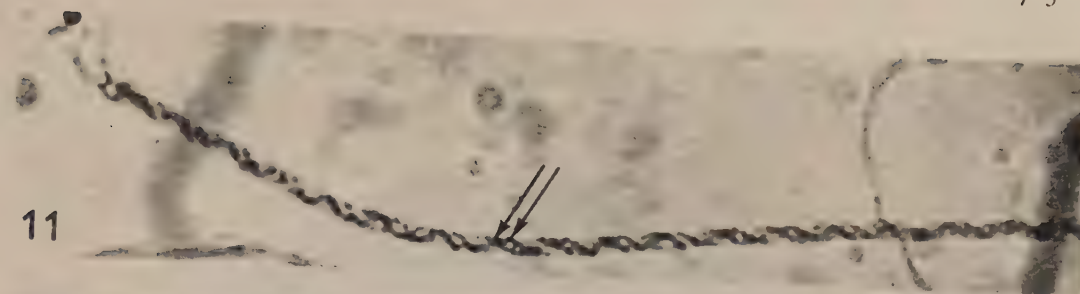


Fig. 11. Microscopie ordinaire. Succinate tétrazolum réductase. Spermatozoïde de Testacelle incubé dans le milieu au succinate NBT. Seules les deux hélices secondaires sont colorées par le formazan (flèches). $\times 2000$.

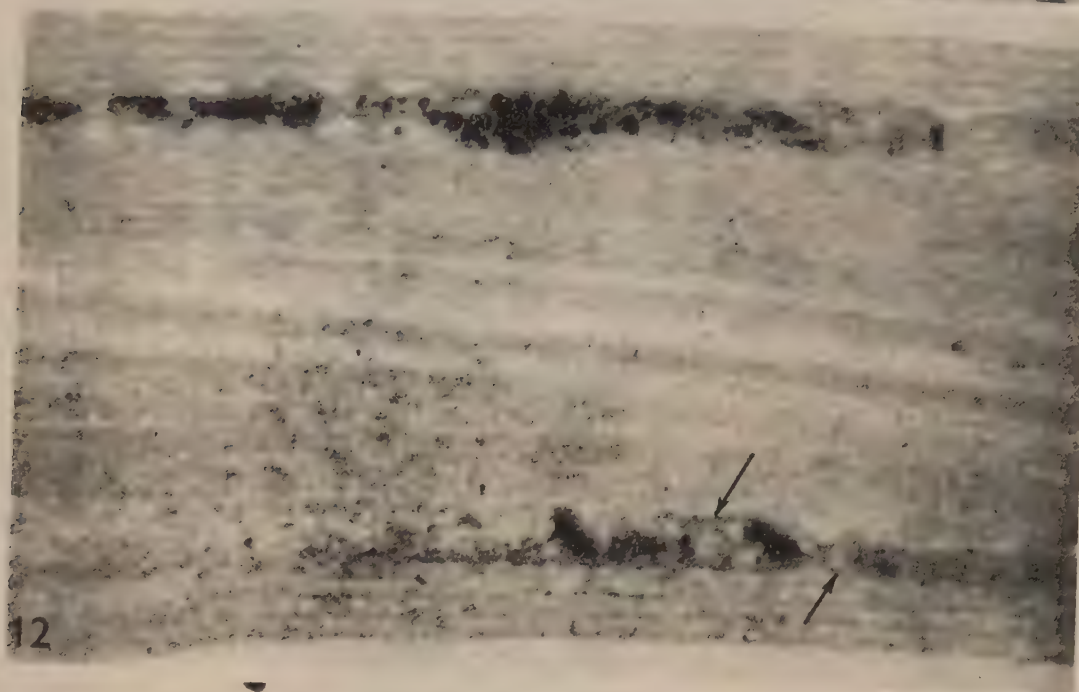
Fig. 12. Succinate tétrazolum réductase. Technique de Seligman au TC-NBT tétroxyde d'osmium. Coupe longitudinale de spermatozoïde d'Escargot incubé dans le milieu au succinate TC-NBT. Les dépôts de noir d'osmium se localisent à l'intérieur de l'hélice secondaire. On remarque que la membrane qui limite ce compartiment en est dépourvue (flèches). $\times 120\,000$.

Fig. 13. NADH_2 tétrazolum réductase. Coupe longitudinale de spermatozoïde d'Escargot incubé dans le milieu au NADH_2 TC-NBT. Dépôts de noir d'osmium uniquement à l'intérieur de l'hélice secondaire. La membrane qui limite ce compartiment en est dépourvue (flèches). $\times 120\,000$.

11



12



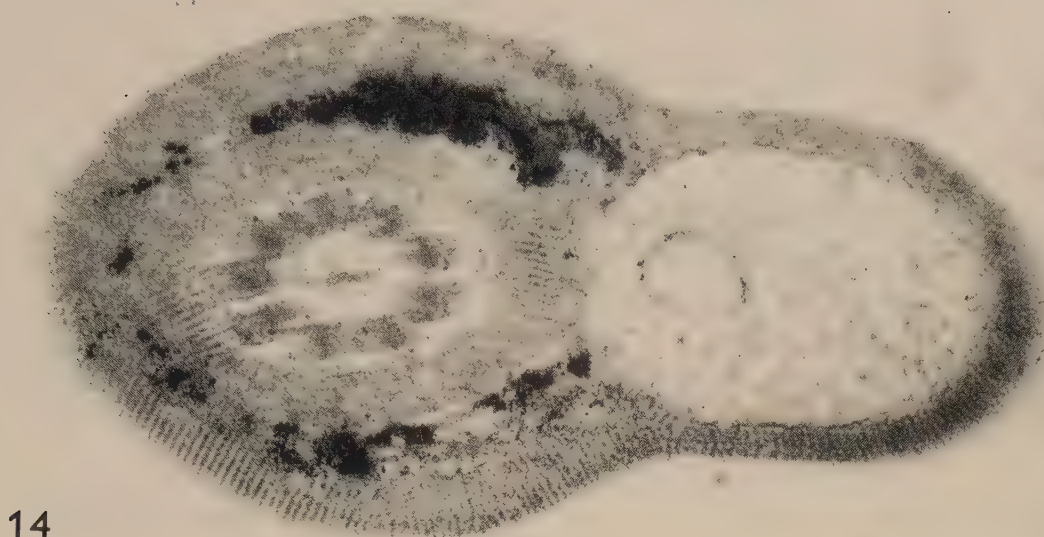
13



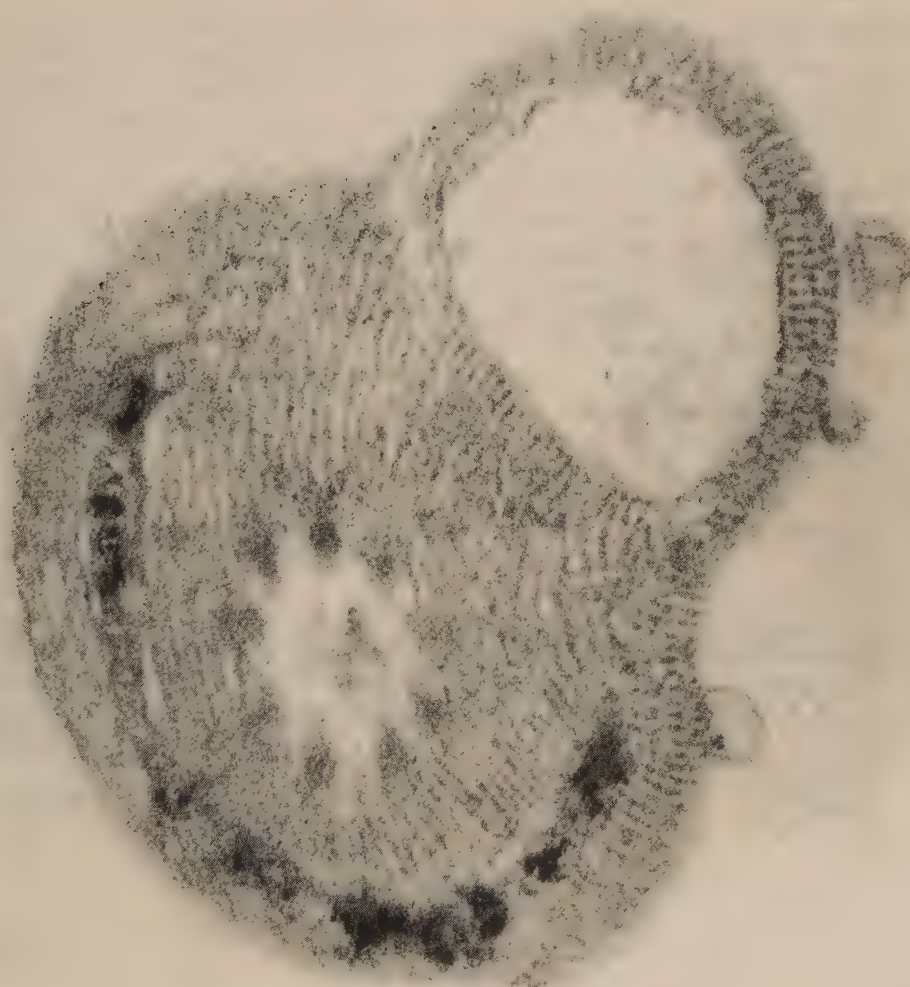
Figs. 14, 15. Technique de Seligman au TC-NBT tétr oxyde d'osmium. Coupes transversales de spermatozoïdes d'Escargot.

Fig. 14. Succinate tétrazolium réductase. Incubation dans le milieu au succinate TC-NBT. $\times 90\,000$.

Fig. 15. NADH_2 tétrazolium réductase. Incubation dans le milieu au NADH_2 TC-NBT. $\times 100\,000$.



14



15

EXISTENCE DE GLYCOGÈNE MITOCHONDRIAL DANS LE SPERMATOZOÏDE DE LA TESTACELLE

Paul PERSONNE et Jean ANDRÉ

Collège Scientifique Universitaire, Amiens

Institut de Recherches sur le Cancer, Villejuif, France

INTRODUCTION

Il a été montré par l'un de nous que la pièce intermédiaire du spermatozoïde de la Testacelle contient un corps mitochondrial gigantesque provenant de l'agglomération, de la fusion, puis de la transformation des mitochondries de la spermatide (André, 1962). L'étude au microscope électronique de ce corps mitochondrial montre qu'il est composé d'un matériel cristallin creusé de trois canaux hélicoïdaux. L'un de ces derniers est de taille un peu supérieure aux deux autres : nous les disons respectivement *hélice principale* et *hélices secondaires* (André, 1962). Ces différents éléments sont de taille suffisante pour qu'ils soient reconnaissables en optique à lumière visible. Leur étude cytochimique par les moyens classiques est donc possible. Ce sont les premiers résultats de cette étude que nous exposons ici. Ils concernent la recherche et l'identification des glucides. Ils sont complétés par des observations faites au microscope électronique.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Nous utilisons l'espèce *Testacella haliotide* (Drap.) (*Mollusca; Gastropoda; Pulmonata*). La glande hermaphrodite est disséquée, fragmentée et, selon les cas, fixée, mise en frottis ou dilacérée dans le milieu d'incubation.

Les techniques cytochimiques pour la microscopie ordinaire sont indiquées dans le tableau I.

Les techniques pour la microscopie électronique sont les suivantes :

a) Sans digestion : fixation au tétroxyde d'osmium à 2 % dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4 selon Millonig (1961) pendant 1 heure; inclusion à l'Epon selon Luft (1961); coloration au plomb selon Karnovsky (1961), parfois précédée d'une coloration à l'acétate d'uranyle.

b) Avec digestion : nous incubons, soit des cellules fraîches non fixées, soit de petits fragments de glande fixés à la formaldéhyde (formol 5 % dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4 pendant 2 heures à la température ordinaire) dans les milieux et pour les temps suivants : salive à 37° pendant 1 heure; amylase à 1 % dans l'eau distillée à 37° pendant 1 heure; trypsine à 0,2 mg/ml dans un tampon borate 0,05 M à pH 8,9 à 37° pendant 1 heure. Puis les cellules sont fixées au tétroxyde d'osmium, incluses à l'Epon et colorées comme ci-dessus.

OBSERVATIONS

I. MICROSCOPIE ORDINAIRE

Les observations faites au microscope ordinaire sont indiquées dans le tableau I.

La réaction de Hotchkiss-Mc. Manus colore intensément l'hélice principale, à l'exclusion de toute autre partie du corps mitochondrial (Pl. I, fig. a). Cette hélice est également Schiff-positive après une oxydation par l'acide chromique (réaction de Bauer; Pl. II, fig. a) le permanganate de potassium (réaction de Casella, Pl. II, fig. b), le bismuthate de sodium (réaction de Lhotka), le tétraacétate de plomb en milieu non anhydre (réaction de Schimizu et Kumanoto, Pl. II, fig. e), elle est Schiff-négative après action de ce même réactif en milieu anhydre (réaction de Criegee, Pl. II, fig. f).

L'A.P.S.-positivité persiste après traitement par le dimédon selon Bulmer (1959) (Pl. II, fig. d). Elle est bloquée par acétylation (réaction de Mc. Manus et Cason; Pl. II, fig. c), ce blocage étant réversible par saponification (réaction de Lillie; Pl. I, fig. d). Elle disparaît après action de la salive (Pl. I, fig. b) ou de l' α -amylase.

Ces résultats nous amènent à conclure que l'hélice principale contient un polysaccharide qui présente les caractères cytochimiques du glycogène.

TABEAU I

Réaction	Méthode	Fixateur	Coloration de l'hélice principale
— A.P.S. (Hotchkiss - Mc. Manus, 1946) ...	F, P	B, H, A, F-cal., Fl (ss. ac.), F	+
— Acide chromique - Schiff (Bauer, 1933, modifié par Lison, 1949)	F, P	H, B, F-cal.	+
— Permanganate de potassium - Schiff (sol. aq. 0,5 %; Casella, 1942)	P	B, H	+
— Bismuthate de sodium - Schiff (Lhotka, 1952)	P	B	+
— T.A.P.-Schiff en milieu anhydre (Criegee, 1931, 1932, 1935; modifié par Lison, 1960; 20 minutes à la température ordinaire) ..	P	B, H	—
— T.A.P.-Schiff en milieu non anhydre (Schimizu et Kumamoto, 1952; 20 minutes à température ordinaire)	P	B, H, F-cal.	+
— A.P.S.-dimedon (Bulmer, 1959)	P	B, H, F-cal.	+
— A.P.S. après acétylation (Mc. Manus et Cason, 1950; Lison, 1960)	P	H	—
— A.P.S. après pyridine (3 heures)	P	B, H	+
— A.P.S. après acétylation puis saponification (Lillie, 1954)	P	H	+
— A.P.S. après digestion par l'α-amylase (sol. aq. 1 %, 1 h à 37°)	P	H	—
— A.P.S. après digestion par la β-amylase (sol. aq. 1 %, 1 h à 37°)	P	H	+
— A.P.S. après digestion par la salive (45 minutes à 37°; Lillie, 1954)	P	H	—
— Bauer après digestion par la salive (45 minutes à 37°; Lison, 1960)	P	H	—
— Schiff sans oxydation préalable (Mc. Manus, 1946)	P	B, H, A FL (ss. ac.) F, C	—
— Carmin de Best (1906)	P	B, H	+
— Métachromasie au bleu de toluidine (sol. à 0,01 % dans le tampon acétate M/5, pH 3,8 à 5,1; Lison, 1960)	P	B, H	—
— Bleu Alcian (sol. 0,1 % dans l'acide acétique 3 %, 30 minutes; Steedman, 1950) ..	P	B, H	—
— Caapture du fer (Müller, 1955)	P	B, H	—

MÉTHODES : F : frottis; P : coupes à la paraffine.
FIXATEURS : A : André (1962); B : Bouin; C : Carnoy; F : formol 10 %; F-cal : formol-calcium; Fl : (ss. ac.) : Flemming sans acide acétique; H : Helly.

La colorabilité de l'hélice principale par le carmin de Best (Pl. II, fig. c) est en accord avec cette conclusion. L'absence de colorabilité au bleu alcian, l'absence de réaction de capture du fer et de métachromasie au bleu de toluidine indiquent qu'il ne s'agit pas d'un mucopolysaccharide.

II. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Sur des coupes de tissu non digéré, la coloration au plomb se fixe intensément sur un matériel granulaire contenu dans l'hélice principale (Pl. III, fig. a). Les grains, sensiblement isodiamétriques, mesurent de 150 à 300 Å. Ils sont particulièrement nombreux et tassés dans la portion médiane et postérieure de la pièce intermédiaire où ils remplissent tout le volume de l'hélice principale. Dans la portion antérieure, ils peuvent être moins nombreux et ne pas remplir toute l'hélice. La positivité à l'A.P.S. suit la même répartition longitudinale (Pl. I, fig. a).

La salive et l' α -amylase n'ont pas d'action notable sur ce matériel granulaire dans les conditions de concentration, durée et température que nous avons employées, si les cellules sont préalablement fixées au formol; elles n'ont qu'une action incomplète sur les cellules non fixées (Pl. IV, fig. a). Mais si la digestion amylasique est précédée d'une digestion trypsique, *le matériel granulaire disparaît totalement* (Pl. IV, fig. b), alors qu'une digestion trypsique seule ne fait que disloquer l'amas des grains, ceux-ci devenant alors encore plus visibles (Pl. III, fig. b).

DISCUSSION

La série des réactions d'oxydation-Schiff et l'action de l'amylase nous ont amenés à conclure que l'hélice principale contient un polysaccharide qui réagit comme le glycogène. A la même localisation, le microscope électronique montre des grains colorables au plomb, disparaissant par l'amylase, morphologiquement identiques aux granules de glycogène monoparticulaire nommés granules β par Drochmans (1962) et que l'on trouve dans les organes et les animaux les plus divers (Biava, 1963; voir dans Revel, 1964, une revue de ces travaux). Ces deux séries convergentes de constatations démontrent que nous avons à faire à du *glycogène sous la forme β* .

Le fait qu'une digestion trypsique seule dissocie les granules et les rend encore plus visibles suggère que ces granules de glycogène sont associés, d'une manière ou d'une autre, à une protéine que l'on peut penser être soit une protéine structurale, soit plutôt, une protéine fonctionnelle ayant pris part à leur formation ou destinée à leur dégradation. C'est sans doute cette protéine qu'une coloration à l'acétate d'uranyle après inclusion au méthacrylate met en évidence sous la forme d'un réseau faiblement grisé (André, 1962; Pl. III, fig. c); selon toute vraisemblance, les grains de glycogène sont situés dans les mailles du réseau, mais ne sont pas mis en évidence par cette technique.

Nous avons constaté que pour obtenir la disparition du glycogène, il était nécessaire de faire une digestion trypsique avant la digestion amylasique, lorsque nous opérons sur des cellules entières (microscopie électronique). Mais la digestion trypsique n'est pas nécessaire si nous opérons sur des coupes (microscopie ordinaire). Cette différence tient sans doute à la pénétration de l'amylase. Cette enzyme est en contact direct avec le contenu de l'hélice principale dans le cas des coupes, alors que dans le cas des cellules entières, elle doit traverser diverses membranes et le manchon cristallin protéique. La molécule d'amylase, assez grosse molécule, ne pénètre que très lentement. Une digestion trypsique préalable fait disparaître les membranes et disloque le cristal protéique (Pl. III, fig. b); l'accès de l'amylase à son substrat est ainsi facilité.

Le dépôt de glycogène commence peu après la métamorphose mitochondriale (André, 1962), c'est-à-dire dans la spermatide d'âge moyen. Il augmente progressivement au fur et à mesure de la maturation du gamète. Pendant ce temps, le métabolisme général de la cellule change profondément: le noyau devient compact et entre en phase d'inertie; la majeure partie du cytoplasme est expulsée. Ce qui reste du cytoplasme est le chondriome métamorphosé, dont il y a tout lieu de penser que l'activité respiratoire est faible. Aucune donnée expérimentale n'existe à ce sujet, mais on sait que ces spermies sont encore immobiles au stade où nous les avons étudiées et qu'elles sont sur le point d'être emmagasinées dans le réceptacle séminal du conjoint, où elles entrent en diapause. Ainsi, l'accumulation du glycogène mitochondrial se fait à un moment où la consommation d'énergie par la cellule diminue très largement. Ces faits suggèrent que l'accumulation du glycogène est un stockage énergétique. Il est probable que cette réserve est catabolisée au moment de la fécondation.

Beaulaton (1964) a récemment rapporté un autre exemple d'accumulation intramitochondriale de glycogène, dans la glande prothoracique du Ver à soie du chêne. Il apparaît donc que certains chondriosomes spécialisés puissent jouer un rôle dans le métabolisme des polysaccha-

rides. Ce rôle est encore tout à fait inconnu, mais il est sans doute plus facile à concevoir si l'on admet, avec certains auteurs (Chèvremont, 1963; Nass et Nass, 1963; Swift, 1964; Ris, communication personnelle; Luck, 1964), que les mitochondries contiennent de l'A.D.N., car il pose le problème de l'apparition, à l'intérieur de mitochondries, d'enzymes qui en sont normalement absentes.

Note ajoutée en cours d'impression. Tandler et Sipkey (*J. Ultrastructure Res.*, 11, 1964, 292-305) viennent de publier un travail sur la tumeur de Warthin dans laquelle ils décrivent diverses modifications mitochondriales et notamment le dépôt, dans certaines mitochondries de grande taille, de grains de 300 Å fortement colorables au plomb. Quoique n'ayant pas fait d'étude cytochimique, ils concluent à la nature glycogénique probable de ces inclusions. Les documents qu'ils présentent sont très démonstratifs de cette conclusion. Ce travail constitue un exemple de plus de glycogène mitochondrial. Il montre que des mitochondries beaucoup moins modifiées en structure que le corps mitochondrial du spermatozoïde de la Testacelle peuvent également contenir du glycogène.

RÉSUMÉ

Les caractères cytochimiques et morphologiques du contenu de l'hélice principale du spermatozoïde de la Testacelle, dont l'origine mitochondriale a été démontrée (André, 1962), indiquent que ce contenu est riche en *glycogène* monoparticulaire probablement associé à une protéine. Ce glycogène mitochondrial apparaît comme une réserve énergétique.

SUMMARY

The cytochemical and morphological features of the content of the principal helix of the *Testacella* sperm-cell, of which the mitochondrial origin has been demonstrated (André, 1962), indicate that this content is rich in monoparticulate *glycogen*, probably associated with a protein. This mitochondrial glycogen appears to be a storage of energy.

BIBLIOGRAPHIE

1. ANDRÉ J., 1962. Contribution à la connaissance du chondriome. « Etude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogénèse ». *J. Ultrastructure Res.*, suppl. **3**, 1-185.
2. BEAULATON J., 1964. Sur l'accumulation intramitochondriale de glycogène dans la glande prothoracique du ver à soie du Chêne *Antherea pernyi* (Guér.) pendant les quatrième et cinquième stades larvaires. *C.R. Acad. Sc.*, **258**, 4139-4141.
3. BIAVA C., 1963. Identification and structural forms of human particulate glycogen. *Lab. Invest.*, **12**, 1179-1197.
4. BULMER D., 1959. Dimedon as an aldehyde blocking reagent to facilitate the histochemical demonstration of glycogen. *Stain Techn.*, **34**, 95-98.
5. CHÈVREMONT M., 1963. Cytoplasmic deoxyribonucleic acids: their mitochondrial localization and synthesis in somatic cells under experimental conditions and during the normal cell cycle in relation to the preparation for mitosis. *International Society for Cell Biology*, Vol. II, Academic Press Inc., New York, 323-333.
6. DROCHMANS P., 1962. Morphologie du glycogène. Etude au microscope électronique de colorations négatives du glycogène particulaire. *J. Ultrastructure Res.*, **6**, 141-161.
7. KARNOVSKY M., 1961. Simple methods for « staining with lead » at high pH in electron microscopy. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, **11**, 729-732.
8. LUCK D., 1964. Some aspects of mitochondrial synthesis in *Neurospora*. *Fourth Annual Meeting of the American Soc. Cell Biology*, Cleveland.
9. LUFT J., 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, **9**, 409-414.
10. MILLONIG G., 1961. Advantages of a phosphate buffer for OsO_4 solutions in fixation. *J. Appl. Phys.*, **32**, 1937.
11. NASS, M.M.K. et NASS, S., 1963. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining reactions. *J. Cell Biol.*, **19**, 593-611.
12. NASS, S. et NAS, M.M.K., 1963. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. II. Enzymatic and other hydrolytic treatments. *J. Cell Biol.*, **19**, 613-629.

13. REVEL J.-P., 1964. Electron microscopy of glycogen. *J. Histochem. Cytochem.*, **12**, 104-114.
14. RIS H. Communication personnelle.
15. SWIFT H., 1964. Nucleic acids of mitochondria and chloroplasts. II^e Congrès International d'Histochemie et de Cytochimie, Francfort; Schiebler T.H., Pearse A.G.E. et Wolff H.H. Editeurs, Springer-Verlag, Berlin, 82.

Manuscrit reçu le 2 novembre 1964.

Planche I. — Réactions A.P.S. Microscopie ordinaire.

Fig. a. — Réaction Hotchkiss-Mc. Manus combinée avec une coloration au bleu de bromophénol mercurique (frottis). Horizontalement, portion antérieure d'un spermatozoïde, comprenant le noyau N, à gauche, et le début de la pièce intermédiaire, très longue, et de structure hélicoïdale. On reconnaît les trois hélices; deux d'entre elles sont faiblement colorées par le bleu de bromophénol (hélices secondaires); la troisième est fortement colorée par la réaction Hotchkiss-Mc. Manus (hélice principale). Cette réaction est d'autant plus intense que l'on s'éloigne du noyau; $\times 2000$.

Fig. b. — Réaction Hotchkiss-Mc. Manus précédée d'une digestion salivaire (coupe). L'hélice principale n'est pas plus apparente que les hélices secondaires. N, noyaux des spermatozoïdes.

Fig. c et d. — Acétylation réversible. - *Fig. c.* — Acétylation. La colorabilité de l'hélice principale est inhibée. - *Fig. d.* — Acétylation suivie de saponification. La colorabilité est régénérée.

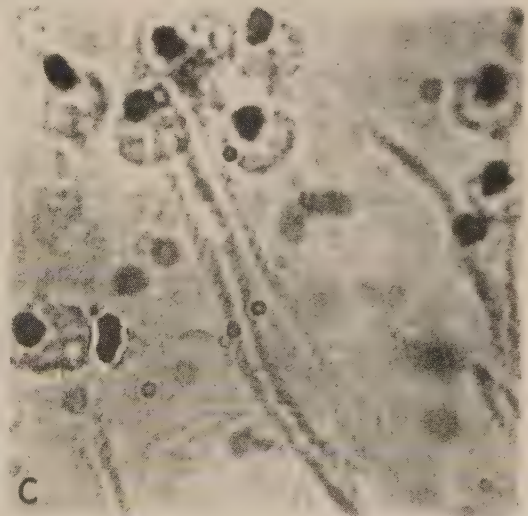
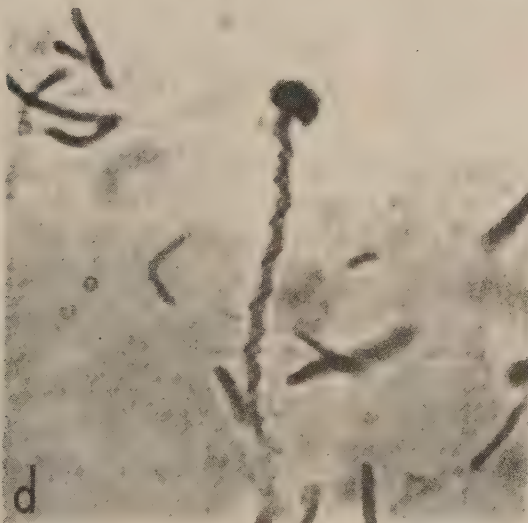
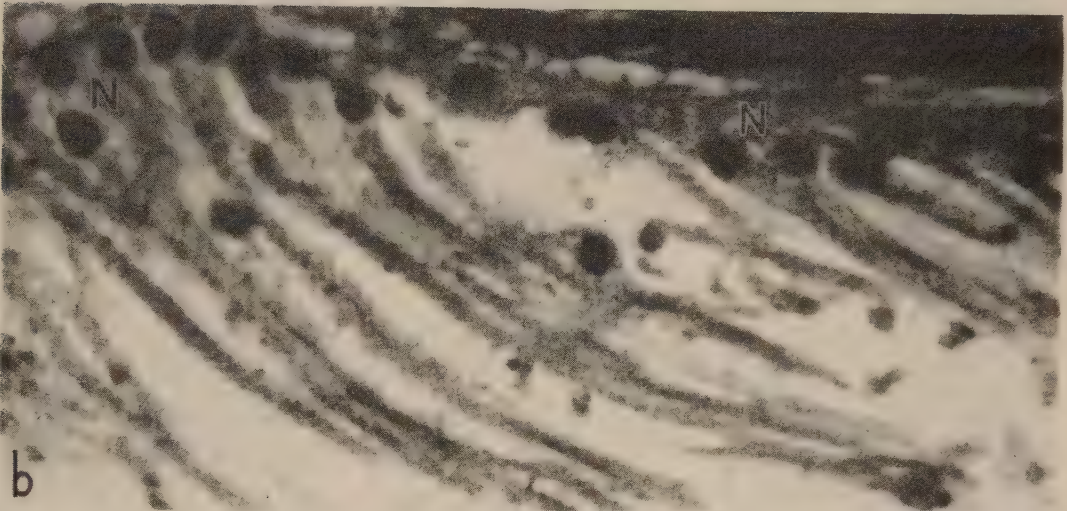
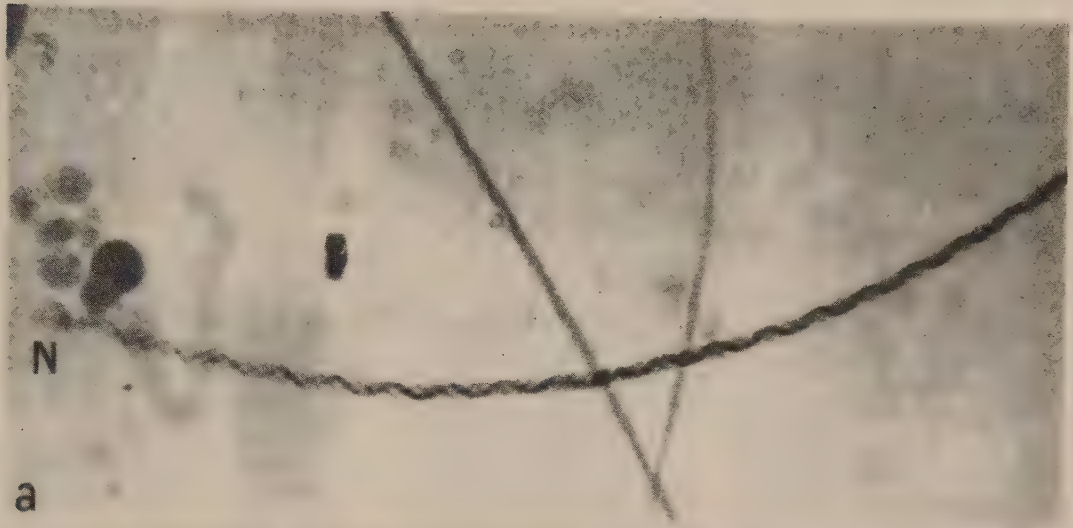


Planche II. — Réactions du glycogène. Microscopie ordinaire.

N, noyaux des spermatozoïdes.

Fig. a. — Réaction de Bauer (coupe). L'hélice principale est colorée (flèche). La coloration est moins intense qu'après la réaction Hotchkiss-Mc. Manus; $\times 2\ 000$.

Fig. b. — Réaction de Casella (coupe). L'hélice principale est nettement colorée; $\times 2\ 000$.

Fig. c. — Coloration au carmin de Best (frottis). L'hélice principale est colorée. Le pas de l'hélice est ici très long car on est dans la portion terminale de la pièce intermédiaire; $\times 2\ 000$.

Fig. d. — Réaction A.P.S. - Dimédon, selon Bulmer. L'hélice principale garde une forte positivité au réactif de Schiff; $\times 2\ 000$.

Fig. e et f. — Réactions tétraacétate de plomb-Schiff. *Fig. e* : réaction de Shimizu et Kumamoto (en milieu non anhydre). L'hélice principale est fortement colorée; $\times 2\ 000$; *Fig. f* : réaction de Criegee (en milieu anhydre). L'hélice principale n'est pas colorée; $\times 2\ 000$.

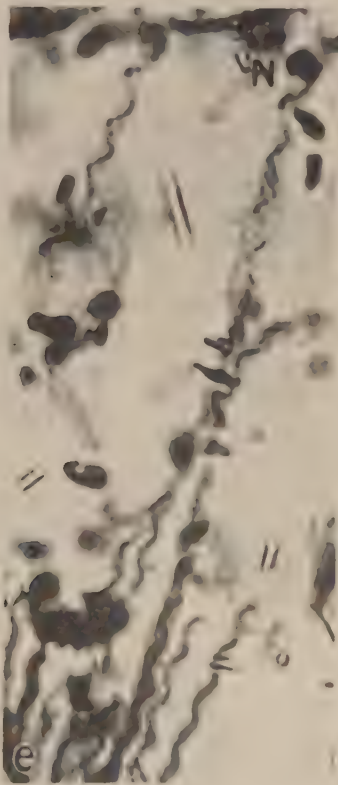
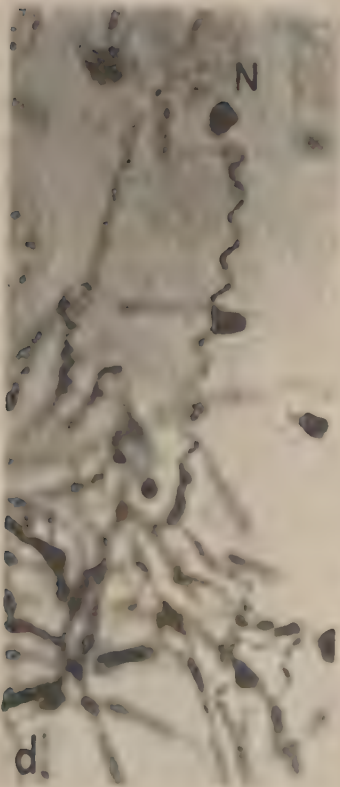
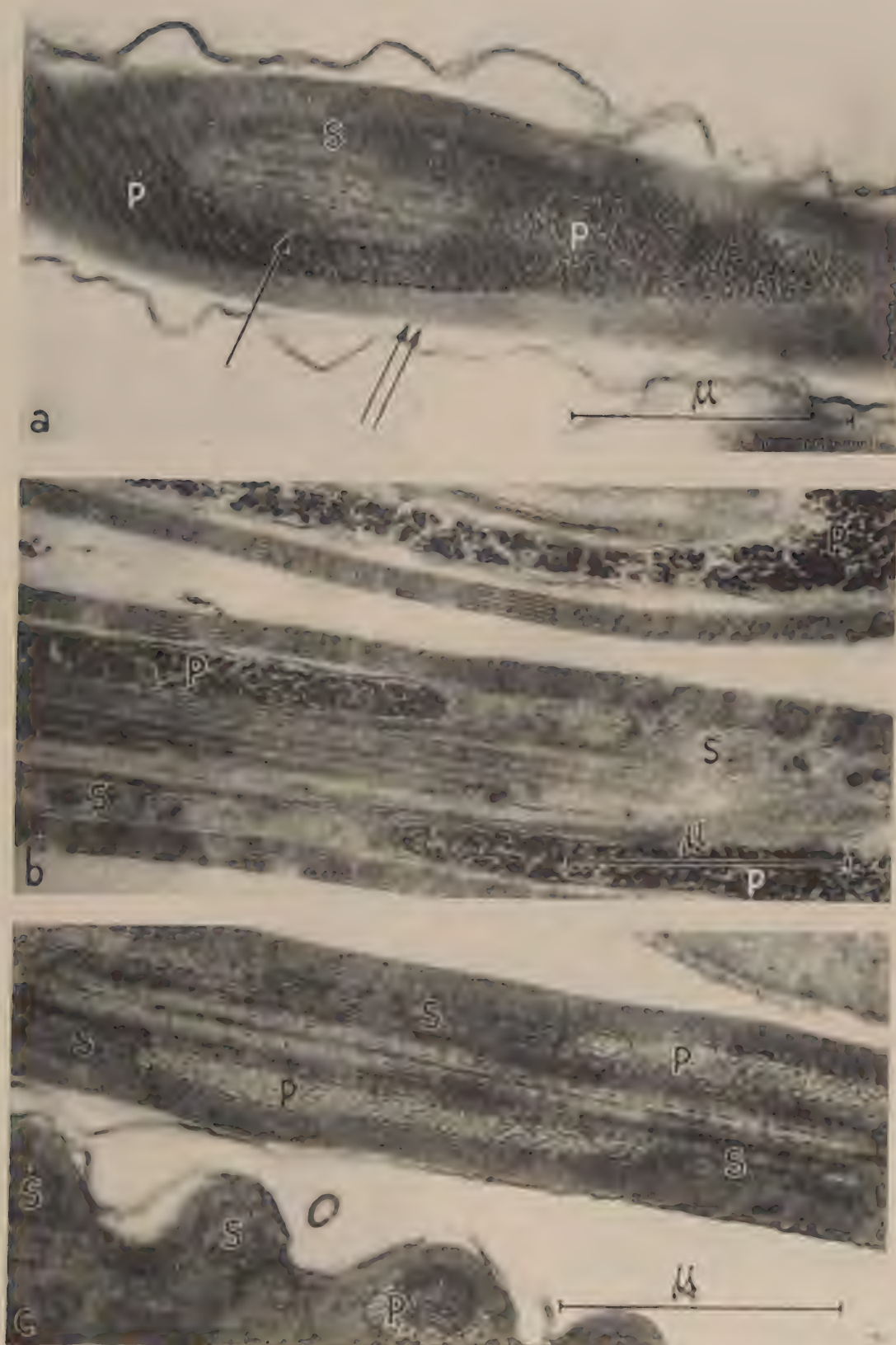


Planche III. — Microscopie électronique.

Fig. a. — Ultrastructure; coloration de Karnovsky. Coupe légèrement oblique de la portion terminale de la pièce intermédiaire. On voit les deux manchons cristallins : le manchon interne périflagellaire (flèche simple) et le manchon externe (flèche double). Entre eux se trouvent les hélices : dans la partie supérieure gauche, les hélices secondaires *S* soudées en un seul ensemble, car on est dans la portion terminale; l'hélice principale *P*, ici très importante en volume (portion terminale), est remplie de granules de 150 à 300 Å de diamètre fortement colorés par le plomb. Ces granules sont du glycogène sous la forme β ; $\times 45\ 000$.

Fig. b. — Digestion trypsique. Coupe longitudinale de la pièce intermédiaire, après digestion trypsique. Les granules de glycogène sont légèrement dissociés les uns des autres. La membrane externe de la cellule a disparu. *P* : hélice principale; *S* : hélices secondaires; $\times 45\ 000$.

Fig. c. — Ultrastructure; coloration à l'acétate d'uranyle. Coupe longitudinale de la pièce intermédiaire après coloration à l'acétate d'uranyle. L'hélice principale *P* est remplie d'un réseau grisé, probablement protéinique. *S* : hélices secondaires; $\times 45\ 000$.



CHEMICAL COMPARTMENTALIZATION IN HELIX SPERMATOOZOA

Winston A. ANDERSON *, Paul PERSONNE ** and Jean ANDRÉ

*Laboratoire de Biologie Cellulaire 4, Faculté des Sciences, 91-Orsay ***
et Laboratoire de Biologie Animale, Collège Scientifique Universitaire, 80-Amiens*

INTRODUCTION

Constructive and regressive cellular alterations occurring during spermiogenesis provide spermatozoa capable of reaching and fertilizing immotile ova. These morphogenetic changes involve the sequestration and condensation of genetic and energetic material and the elimination of nuclear and cytoplasmic components non-essential to fertilization (Fawcett, 1958; André, 1962, 1963; Anderson *et al.*, 1967; Anderson, 1967a). Presumably, pronounced chemical changes accompany alterations in substructure of organelles differentiating from simple to complex forms (Tice and Barrnett, 1963) and it is well known that hydrolases, particularly acid phosphatase, play key roles in the physiological autolysis of differentiating and regressing systems (Weber, 1957a, b; Brachet *et al.*, 1958). An example of this situation is furnished by the complex paracrystalline middle piece of pulmonate spermatozoa, that evolved from the fusion of typical mitochondria (Grassé *et al.*, 1956; André, 1962), that contains glycogen (Personne and André, 1964; André, 1965; Anderson and Personne, 1967b) and intense phosphorylase activity in its "major helix" (Personne, 1966). In addition, enzymes of the tricarboxylic acid cycle are segregated to the region named the

*Supported by Postdoctoral Fellowship (Grant # PF-342) from the American Cancer Society, Inc. New York.

** This investigation is presented in partial fulfillment of a "Thèse d'Etat ès Sciences naturelles".

*** This investigation has been partially supported by the C.N.R.S. (RCP 21 and LA86).

"secondary helix" (Personne and Anderson, 1967) while spectrophotometric studies indicate the presence of most of the intermediates of the electron transport chain in functional form and concentrated state (Ritter and André, unpublished results). The structure of the mitochondrial derivative of this spermatozoon is highly organized with respect to the arrangement of its components and provides a good opportunity to correlate structural and chemical compartmentalization. In this study attention is therefore directed to the cytochemical localization of some phosphatases in spermatids and spermatozoa of *Helix aspersa*.

MATERIAL AND METHODS

ACID PHOSPHATASE ACTIVITY

Small pieces of ovo-testes and mature spermatozoa isolated from the hermaphroditic duct of *Helix* were fixed for 45 mins in cold, cacodylate-buffered glutaraldehyde containing 5 % sucrose at pH 7.4. After fixation the tissues were rinsed in cold acetate buffer (pH 5.0) for periods ranging from 5-30 mins and then incubated for periods up to 45 mins at room temperature in the standard acid phosphatase medium of Gomori (1952). Control experiments consisted of the incubation of tissues fixed for 10-20 mins in 2 % osmic acid, by using heat-inactivated specimens, the incubation of glutaraldehyde-fixed tissue in medium containing lead nitrate but lacking beta-glycerophosphate or by inhibiting the enzyme with 0.01 M sodium fluoride added to the incubating medium. Subsequent to incubation all tissues were washed rapidly in two changes of acetate buffer at pH 5.0, while some samples were rinsed in 3 changes of 2 % acetic acid.

ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY

Mature spermatozoa were fixed for 30-45 mins at 4 °C in 2 % cacodylate buffered glutaraldehyde (pH 7.4). After 3 rinses in cold cacodylate buffer containing 5 % sucrose, the sperm were rinsed once in Tris-maleate buffer (pH 9.0) and incubated for 5-30 mins at 5-10 °C in medium containing beta-glycerophosphate and lead nitrate. The medium contained 10 ml Tris-maleate buffer (0.1 or 0.2M; pH 9.0), 10 ml sodium

beta-glycerophosphate (1.0-1.5 %), 23.5 ml distilled water and 6.5 ml 1-2 % lead nitrate, and is modified from the medium of Hugon and Borgers (1967). Control samples were incubated in medium from which beta-glycerophosphate was omitted. After incubation spermatozoa were post-fixed for 45-60 mins either in cacodylate-buffered glutaraldehyde (pH 7.4) or in 2 % osmic acid.

GLUCOSE-6-PHOSPHATASE ACTIVITY

The procedures according to Chiquione (1953) and Burstone (1962) were used to demonstrate glucose-6-phosphatase activity. Unfixed spermatozoa or sperm fixed for 10-20 mins in cold glutaraldehyde (2 % pH 7.4), were washed several times in distilled water and then incubated at pH 6.7 in medium containing glucose-6-phosphate and 0.006M lead nitrate. The specimens were incubated at 37 °C for 15-30 mins. In control experiments spermatozoa were incubated in medium from which glucose-6-phosphate was omitted.

THIAMINE PYROPHOSPHATASE ACTIVITY

Unfixed and glutaraldehyde-fixed spermatozoa, that were washed in several changes of sodium cacodylate buffer at pH 7.0, were incubated for 15-30 mins at 37 °C in medium containing thiamine pyrophosphate and lead nitrate (Novikoff and Goldfischer, 1961; Meek and Bradbury, 1963). Either manganese or magnesium ions were added to the incubation medium. Incubated cells were rinsed in 3 changes of cacodylate buffer, and subsequently post-fixed in 2 % cacodylate-buffered glutaraldehyde. Thiamine pyrophosphate was omitted from the incubation medium in control experiments.

ADENOSINE TRIPHOSPHATASE ACTIVITY

Spermatozoa isolated from the hermaphroditic duct of *Helix* are immotile; motility can be induced by immersing sperm in medium containing 5-10 mg/ml trypsin (André, personal communication; Anderson and Personne, 1967b). ATPase activity appears consistently in trypsin-treated, motile spermatozoa of *Helix*. Furthermore, ATPase activity is intense in unfixed or in spermatozoa briefly fixed in cold glutaraldehyde (5-15 mins); prolonged fixation in glutaraldehyde 45 mins or longer) reduces ATPase activity in these cells.

In this study spermatozoa were fixed for 5-10 mins in 2 % glutaraldehyde buffered with sodium cacodylate at pH 7.2 and were rinsed in 3 changes of sodium cacodylate or Tris-maleate buffer at pH 7.2 prior to incubation in medium containing substrate and capture agent. Unfixed and glutaraldehyde-fixed spermatozoa were incubated for 15-60 mins at 37 °C in medium containing ATP, magnesium sulfate, lead nitrate and Tris-maleate buffer at pH 7.2 (Wachstein and Meisel, 1957; Padykula and Gauthier, 1963). In some experiments, the spermatozoa were rinsed in 3 changes of 2 % acetic acid.

For demonstration of Ca^{++} stimulated ATPase activity, sperm were incubated either in medium containing ATP, calcium chloride and sodium barbital at pH 9.4 (Padykula and Herman, 1955) or in medium consisting of ATP, calcium chloride, sodium veronal at pH 9.0 and cysteine (Nelson, 1958). The cells were incubated at room temperature or at 37 °C for 10-30 mins and then washed in sodium barbital or veronal buffer at pH 9.0 for 10-15 mins.

Control experiments for Mg^{++} and Ca^{++} activated ATPase activity involved the incubation of unfixed and glutaraldehyde-fixed spermatozoa in medium lacking ATP but containing lead nitrate or calcium chloride respectively. Control experiments also included the incubation of heat inactivated sperm in medium containing substrate and capture agent (lead nitrate or calcium chloride).

After incubation, washed specimens were fixed for 30-40 mins in 2 % cacodylate-buffered glutaraldehyde; after glutaraldehyde fixation some samples were post-fixed for 45-60 mins in 2 % osmic acid in water.

PREPARATIVE TECHNIQUES FOR ELECTRON MICROSCOPY

Subsequent to incubations, spermatozoa of *Helix* were either fixed in 2 % cacodylate-buffered glutaraldehyde that contained sucrose (Anderson *et al.*, 1967) or in 2 % osmic acid in distilled water for 45-60 mins. The cells were dehydrated rapidly in acetone-water solutions and embedded in an epon-araldite mixture (Anderson and Ellis, 1965) with 1.5 % DMP-30 added as activator. Thin sections cut with glass knives, were stained first for 15 mins in a saturated solution of uranyl acetate in 50 % ethanol and then for 5 mins in the stock solution of lead citrate (Reynolds, 1963). Unstained or double-stained sections were examined with a Siemens Elmiskop 1A electron microscope.

OBSERVATIONS

LOCALIZATION OF ACID PHOSPHATASE ACTIVITY

In early spermatids of *Helix*, acid phosphatase activity is discretely localized in the perinuclear space, within the cisternae of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and in the matrix of mitochondria and multivesicular bodies (Pl. I, fig. *a*). Intramitochondrial detection of enzyme reaction product is not thought to be artifactual since the lead phosphate precipitate appears consistently in mitochondria of male sperm cells, is absent from mitochondria in adjacent oocytes and hepatopancreatic tissue and is absent in control specimens.

Subsequent maturation changes, involving fusion of typical and pleomorphic mitochondria and the incorporation of cytoplasmic components including cisternae of the endoplasmic reticulum lead to formation of the complex paracrystalline middle piece of *Helix* (André, 1962; Personne and Anderson, unpublished results). A band of microtubules surrounding the mitochondrial derivative of the spermatid participates in the maturation changes of these cells (Anderson and Personne, 1967b). In the immature spermatozoon of *Helix*, acid phosphatase activity is totally absent from the mitochondrial derivative, but is instead localized on the plasmalemma, within the cisternae of the endoplasmic reticulum surrounding the manchette (Pl. I, fig. *b* and *c*) and in the flagellum (Pl. I, fig. *b*). No enzyme activity is present in the cytoplasmic background surrounding the manchette. Breakdown of the manchette coincides with the emergence of free spermatozoa. The appearance of acid phosphatase activity on the manchette coincides with the disarrangement of the microtubules (Pl. II, fig. *a*) and disintegration of the cytoplasm peripheral to the manchette (Pl. II, fig. *b*). At this time also, intense enzyme reaction product is specifically localized in the flagellum, particularly between the central tubules and coarse fibers (Pl. II, fig. *a*, *b* and *c*). In the mature sperm (Pl. II, fig. *c*), dense accumulations of lead phosphate are relegated to the axoneme, while in control experiments spermatozoa contain no reaction product (Pl. II, fig. *d*).

Acid phosphatase activity end product persists in mitochondria, multivesicular bodies, lysosomes and in the cytoplasmic background of degenerating residual bodies.

GLUCOSE-6-PHOSPHATASE ACTIVITY

Glucose-6-phosphatase plays a key role in glycolytic sequences in tissues utilizing glucose for energy. The presence of glycogen in the

middle piece of sperm of *Helix* suggested the possible participation of glycolytic enzymes in the metabolism of this cell. A glutaraldehyde-resistant glucose-6-phosphatase appears consistently in the middle piece of these spermatozoa. Enzyme reaction product is specifically relegated to the matrix between the coarse fibers surrounding the central tubules of the axial filament and on the boundary-membrane of the secondary helix (Pl. III, fig. a and c). After incubation in substrate-free medium lead phosphate deposits may occasionally be seen on the surface of spermatozoa (Pl. III, fig. b and d). The interior of the middle piece in control specimens is relatively free of enzyme reaction product (Pl. III, fig. b and d).

PYROPHOSPHATASE ACTIVITY

When unfixed and glutaraldehyde-fixed spermatozoa are incubated to show thiamine pyrophosphatase activity enzyme reaction product is detected on the external membrane, on the outer surface of the crystal of the mitochondrial derivative and on the inner, periflagellar membrane (Pl. IV, fig. a). In very rare instances slight enzyme reaction product is seen among the flagellar tubules. Control specimens show no enzyme reaction product (Pl. IV, fig. b). An enzyme capable of hydrolyzing thiamine pyrophosphate is present in mitochondria and in the cisternae of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus of spermatids of *Helix* (Meek and Bradbury, 1963). Presumably during development of the spermatid this enzyme is transmitted via these organelles to the mitochondrial crystal.

ADENOSINE TRIPHOSPHATASE ACTIVITY

The demonstration of ATPase in sperm of *Helix* requires that the cells are motile, that enzyme activity is not destroyed by prolonged fixation in glutaraldehyde and that magnesium ions are present in the medium. This enzyme has not been detected in the presence of Ca^{++} ions, even after prolonged incubation.

Magnesium activated ATPase activity at pH 7.2 is demonstrable after 15-30 mins incubation in the Wachstein-Meisel (1957) or Padykula-Gauthier (1963) medium. After 15 mins incubation the enzyme reaction product is discretely localized around the central flagellar tubules and between adjacent coarse fibers (Pl. IV, fig. c and d). In some cases enzyme end product is intense and in all cases is confined to the axial

filament of the spermatozoon (Pl. V, fig. *a* and *b*). When viewed in longitudinal section the lead phosphate precipitate lies close to the central tubules and between the central tubules and coarse fibers. The end product is relegated to regions of the flagellum that correspond to secondary fibers or "spokes" that surround the central tubules (Pl. V, fig. *c*). After 30 mins incubation, enzyme reaction product completely occludes the flagellum (Pl. VI, fig. *a* and *b*). Some non-specific localization appears on the crystal after prolonged incubation. Even after 30 mins incubation ATPase reaction product is absent from sperm of control experiments (Pl. VI, fig. *c*).

SOME OTHER PHOSPHATASES

A nonspecific beta-glycerophosphatase is present in the flagellum of sperm incubated at pH 7.0, but enzyme activity in the alkaline range (pH 9.0) is entirely lacking. Even after prolonged incubation (60-90 mins) for alkaline phosphatase activity the spermatozoa are devoid of end product.

DISCUSSION

THE SIGNIFICANCE OF ACID PHOSPHATASE DURING SPERMIOGENESIS

The maturation process involves the structural and physiological transformation of organelles to more stable forms, and the transient establishment of cytoplasmic compartments related to cell elongation and cytoplasmic elimination. In essence, during spermiogenesis only components essential to fertilization are preserved, and all other components are discarded (Burgos and Fawcett, 1955; Fawcett, 1958; André, 1962, 1963, 1965; Anderson *et al.*, 1967; Anderson, 1967*a*). It is not surprising therefore that during spermatid differentiation, acid phosphatase activity appears in organelles undergoing profound structural changes and in the non-essential cytoplasm destined to be discarded. The detection of enzyme reaction product in the perinuclear space, endoplasmic reticulum and Golgi apparatus suggests that these membrane-systems are involved in the segregation of hydrolases required for the controlled hydrolysis of some cell components or for the utilization of these enzymes in other metabolic processes. The presence of acid

phosphatase activity in the endoplasmic reticulum surrounding the manchette and on the manchette coincides with the dismantling of this system of microtubules and the degeneration of the residual cytoplasm. These findings suggest that hydrolytic enzymes participate in the controlled autolysis of the manchette and cytoplasm and in the release of the mature spermatozoon from the cytoplasm.

Acid phosphatase activity is also encountered in the mitochondria of spermatocytes and early spermatids. The regular appearance of lead deposits in mitochondria and the absence of direct association between the endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and mitochondria at this stage, suggests that this enzyme is produced and sequestered within mitochondria. The constant appearance of acid phosphatase activity in spermatid cells and the total absence of lead phosphate deposits in mitochondria of adjacent ovarian, hepatopancreatic and muscle tissues suggests that these deposits are not due to the non-specific absorbance of lead phosphate but to the endogenous existence of the enzyme. Acid phosphatase activity has also been observed in the mitochondria of sea urchin spermatozoa (Anderson, unpublished results). In spermatids of *Helix*, the intramitochondrial detection of enzyme reaction product occurs prior to and concomitant with changes of substructure and fusion of these organelles to form the middle piece. The presence of this enzyme in mitochondria suggests that acid hydrolases may participate in the structural alterations of these organelles. Whereas acid phosphatase activity persists in the mitochondria of the residual cytoplasm, enzyme activity is absent from the mitochondrial portion of the middle piece in mature spermatozoa.

In mature sperm present in the hermaphroditic duct of *Helix*, intense enzyme reaction product is relegated to the axial filament. Acid phosphatase enzyme reaction product is observed in the axial filament of spermatids, prior to the fusion of the mitochondrial components, suggesting the existence of a hydrolase distinct from the mitochondrial acid phosphatase.

The consistent appearance of acid phosphatase activity in the flagellum of mature spermatozoa, suggests that this enzyme may play several roles in this area. Acting strictly as a hydrolase it could regulate the content of hydrolyzable substrate and the equilibrium and activities of other enzymes in the axial filament. In this manner it could play a decisive role in the regulation process of spermatozoan metabolism. Furthermore, by the non-specific dephosphorylation of phosphate esters, it could enter into the metabolic pathways of nucleoside phosphates. By participating in the production and mobilization of free phosphate ions in the vicinity of the kinetic elements it could control the free phosphate "pool" necessary for the resynthesis of ATP and other

high-energy phosphate compounds used in the kinetic and metabolic functions of the spermatozoon.

The participation of hydrolases in the regulation process has been postulated by de Duve (1959). In this respect an excellent example is afforded by the involvement of cholinesterase in the regulation of the level and activity of acetylcholine during nerve and muscle function. It has also been established that a specific phosphatase functions in the control of phosphorylase activity Sutherland and Rall, 1958; Krebs and Fischer, 1962). It is not unusual therefore that acid phosphatase might function in the regulation of phosphate metabolism in sperm of *Helix*.

PHOSPHORYLASE ACTIVITY

It is well established that an active phosphorylase plays a regulatory role in glycogen metabolism (Stetten and Stetten, 1960; Rall and Sutherland, 1961). In the presence of inorganic phosphate, phosphorylase catalyzes the breakdown of glycogen to produce glucose-1-phosphate and the reaction producing polysaccharide from glucose-1-phosphate. The phosphorylase mechanism is thought to be rate limiting step in endogenous glycolysis in Hela cells (Wu, 1959). Since this enzyme occupies the major helix of the middle piece of gastropod spermatozoa, it is believed to participate in the glycogenolytic and glycolytic activities of these sperm. Its detection in the major helix further suggests that it bears close relationship to the particulate glycogen present in this compartment (Personne, 1966).

SIGNIFICANCE OF GLUCOSE-6-PHOSPHATASE

Glucose-6-phosphate (G6P) occupies a key position in carbohydrate metabolism, since it is a common intermediate of glycogenesis, glycogenolysis, and glycolysis (Krebs and Fischer, 1962). The disposition and relationship of G6P to competing metabolic processes is of great importance in their regulation. For example, enzymatic hydrolysis of G6P on the one hand, and inhibition of G6Pase activity by glucose on the other, might underlie the physiological control of this intermediate during glycogenolysis and/or glycolysis.

G6Pase is exclusively associated with the microsomal fraction of mouse and rat livers (Beaufay and deDuve, 1957; Beaufay *et al.*, 1959), and in rabbit and guinea pig kidneys (Hers *et al.*, 1951). Presumably, in these organs G6Pase catalyzes the reaction producing glucose and thus controls glucose level in the blood.

By histochemical methods, this enzyme has been localized in the endoplasmic reticulum of unfixed and hydroxyadipaldehyde-fixed livers (Tice and Barrnett, 1962) and in glutaraldehyde-fixed liver and kidney tissues (Goldfischer *et al.*, 1964). In unfixed and glutaraldehyde-fixed sperm of *Helix*, intense G6Pase activity is also detected (Anderson and Personne, 1967a). The localization of the enzyme bears specific relationship to the secondary helix and to the elements of the axial filament. Similarly, intense G6Pase activity is present along cristae of mitochondria of sea urchin spermatozoa (Anderson, unpublished results), on isolated outer mitochondrial membranes (Parsons *et al.*, 1967), while intramitochondrial glucose-1-phosphatase activity is observed in rat heart muscle (Molbert *et al.*, 1960; von Deimling *et al.*, 1960). The presence of glycogen in the major helix of the middle piece of *Helix* spermatozoa suggests that glycogenolytic and glycolytic pathways are active in the metabolism of these cells. The presence of G6Pase activity in the middle piece of *Helix* is of uncertain significance, since this enzyme normally catalyses glucose production. Since glucose can not be stored in significant amounts it must either be ejected from the cell or remetabolized. If free glucose is incorporated in the glycolytic cycle or into any other metabolic sequence it does so at the expense of ATP; thus glucose utilization is an energy-requiring mechanism that detracts from net ATP production. Under aerobic conditions, mechanisms other than the glycolytic pathway are perhaps functional in the metabolism of these cells. In this manner, rephosphorylated glucose could pass via the oxidative shunt to provide mechanisms for, (1) the synthesis of ribose (an essential component of free nucleotides and nucleic acids), and (2) an aerobic by-pass around the glycolytic and tricarboxylic acid cycles. In addition, free glucose could be involved in lipid biosynthesis, the production of mucopolysaccharides and glycoproteins; thus carbohydrate utilization may not only have a sparing effect on endogenous lipids but may also be involved in lipid synthesis (Turner, 1962). Finally free glucose levels could determine the relative rates of glycogenesis and glycogenolysis.

PYROPHOSPHATASE ACTIVITY

By cytochemical methods thiamine pyrophosphatase (TPPase) activity has been detected in the cisternae of the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum of cells (Novikoff and Goldfischer, 1961; Meek and Bradbury, 1963). However, TPPase activity is also present in multivesicular bodies and in the matrix of mitochondria of *Helix aspersa* (Meek and Bradbury, 1963), and in the tegument and convoluted

membranes of mature crustacean spermatozoa (Yasuzumi and Lee, 1966). The convoluted membranes of crustacean spermatozoa are of mitochondrial origin (Anderson and Ellis, 1967). Thus TPPase activity appears not to be confined to the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum, but is present also in mitochondria of spermatids and in mitochondrial derivatives of spermatozoa. The presence of enzyme reaction product in the endoplasmic reticulum and mitochondria in spermatids of *Helix* (Meek and Bradbury, 1963) suggests that this enzyme is synthesized in these organelles and transmitted by them to the mature middle piece.

Pyruvate occupies a principal position in the aerobic and anaerobic metabolism of carbohydrates. In tissues metabolizing chiefly carbohydrates, thiamine pyrophosphate is indispensable to the oxidative phosphorylation of pyruvate. This coenzyme is therefore essential for the complete oxidative phosphorylation of pyruvate and α -ketoglutarate. Consequently, even if the significance of a pyrophosphatase is unknown per se, its consistent appearance on the surface of the mitochondrial crystal and on the periflagellar membrane suggests that it has a metabolic role.

Pyrophosphate inhibits flagellar ATPase activity and a Mg^{++} dependent inorganic pyrophosphatase is localized in the vicinity of the axonemal elements in spermatozoa (Nelson, 1959; 1962). Pyrophosphate acts as a plasticizer in glycerinated muscle and could play a similar role in relaxing contracted axonemes. Pyrophosphatase activity is present on the periflagellar membrane in sperm of *Helix* and thus lies in close proximity to coarse fibers and regions of the axoneme that show positive, Mg^{++} stimulated ATPase activity. Under the scheme suggested by Nelson (1962, 1967), the interaction of complexes formed between pyrophosphate and ATP with Mg^{++} ions, under the mediation of a pyrophosphatase, could provide the mechanism of contraction and relaxation during sperm motility.

ADENOSINETRIPHOSPHATASE ACTIVITY

Biochemical and cytochemical evidence attests to the presence of ATP and ATPase in sperm tails (Mann, 1945, 1967; Bishop, 1962; Nalson, 1958, 1962, 1967; Nagano, 1965) and in cilia and flagella (Tibbs, 1962; Gibbons, 1965; Satir, 1965). Energy for motility may be provided by dephosphorylation of ATP (Hoffman-Berling, 1959) and there is some evidence that an ATP-dephosphorylating enzyme is an integral part of cilia and sperm tails (Gibbons, 1965). It is speculated that modifications of this enzyme-structural protein complex, similar to that found in

muscle contraction (Huxley, 1965), could provide the mechanical forces for contraction to the axonemal elements.

Despite the evidence of an axonemal ATPase, the cytochemical localization of this enzyme and its relationship to the kinetic apparatus has been contradictory. Such inconsistency in ATPase localization has perhaps been as a result of the following factors: 1) variations in techniques used by different investigators, 2) the existence of several ATPases with distinct ionic requirements and activators or 3) artifacts due to the dephosphorylation of ATP by non-specific phosphatases. Consequently, when sperm tails of *Drosophila* and rotifer cilia are briefly prefixed in osmic acid, ATPase activity is in the first case localized in the inter-satellite space peripheral to the doublets (Daems *et al.*, 1963) or outside peripheral fibers 1 and 5 in cilia of rotifer (Lansing and Lamy, 1961). Prefixation in osmic acid may prevent optimal infiltration of the substrate and inhibit the activity of the enzyme, thus masking the actual site of the enzyme reaction product. Subsequent to fixation in osmic acid only the activity of highly resistant ATPase molecules will be observed, and the absence of activity will be noted, particularly if this enzyme exists in low concentrations. Nelson (1958; 1962), using the freeze-drying technique, localized a specific Ca^{++} activated ATPase exclusively in the 9 coarse fibers peripheral to the axonemal doublets of mammalian sperm tails. A Ca^{++} activated ATPase in coarse fibers, suggests that this enzyme is similar to the "myosin" or "muscle" ATPase of mammalian diaphragm which also has a requirement for Ca^{++} ions (Padykula and Gauthier, 1963). A contractile role has been attributed to the coarse fibers (Cleland and Rothchild, 1959), and a Ca^{++} stimulated ATPase in these fibers could effect this role (Nelson, 1958).

It has been shown that Mg^{++} ions on the one hand inhibit "muscle" ATPase activity, but on the otherhand stimulate "mitochondrial" ATPase activity in diaphragm muscle (Padykula and Gauthier, 1963). Thus when cells are unfixed or prefixed in aldehydes prior to incubation in medium containing Mg^{++} ions, enzyme reaction product is localized next to the cristae of mitochondria (Ashworth *et al.*, 1963; Otero-Vilardebo *et al.*, 1963; Scarpelli and Craig, 1963; Anderson, unpublished results), in mitochondria (Wachstein *et al.*, 1962; Padykula and Gauthier, 1963), but on the surface of mitochondria and within the axoneme of sperm tails (Nagano, 1965). The mitochondrial localization of an ATPase that is specific to membrane rather than to the matrix has been determined by biochemical procedures (Siekevitz *et al.*, 1958). Based on cytochemical data Mg^{++} stimulated ATPase has been localized between the coarse fibers and central tubules and in the vicinity of the spokes that surround the central tubules (Nagano, 1965).

It seems improbable that this ATPase participates in oxidative phosphorylations within flagellum, and it is more likely that it represents part of the contractile structure or functions to facilitate ion exchange to and from this region.

In unfixed, trypsin-activated motile spermatozoa of *Helix*, intense Mg^{++} dependent ATPase manifests itself. ATPase activity also appears after mild fixation in glutaraldehyde, however, its activity and intensity is markedly reduced. This investigation confirms the finding of Nagano (1965) in that Mg^{++} activated ATPase appears in the vicinity of the spokes or filaments that extend from the central tubules and not on the coarse fibers themselves. ATPase activity also appears on the surface of the central axonemal tubules and at the interface between adjacent coarse fibers. It is speculated that an ATP-dephosphorylating enzyme constitutes the filaments or spokes and perhaps occupies the matrix between the central and peripheral tubules of the flagellum. This ATPase structural protein complex is well situated to create mechanical stress and contraction by interacting with the axonemal tubules and fibers. On the otherhand an ATPase surrounding the contractile elements may be involved in the active exchange to and from this region. This investigation does not confirm the findings of Nelson (1958; 1962) since Ca^{++} stimulated ATPase activity is totally absent from the flagellum of *Helix*.

Additional evidence obtained from studies on glycerinated models of cilia and flagella (Satir and Child, 1963; Satir, 1965), and from differential extraction and reconstruction studies combined with electron microscopy (Gibbons, 1965) attest to the presence of ATPase activity within framework of the peripheral doublets. The latter studies indicate that a 14S and 30S globular protein (named dynein), that has ATPase activity constitutes the arms of the peripheral doublets.

Based on cytochemical evidence either a Mg^{++} or Ca^{++} stimulated ATPase has been associated with the kinetic apparatus of sperm tails, cilia and flagella. It remains to be determined if there exists two separate enzymes with distinct ion specificities or if this is a single enzyme that acts at different sites when exposed to Ca^{++} or Mg^{++} ions. Recent findings by Gordon and Barnett (1967) indeed suggest the existence of two distinct ATPases in the flagella of mammalian spermatozoa. A Ca^{++} dependent ATPase in the coarse fibers (Nelson, 1958, 1962), an ATP-dephosphorylating enzyme forming the arms of one outer doublet (Gibbons, 1965), a Mg^{++} activated ATPase in the vicinity of the spokes that surround the central tubules (Nagano, 1965; Anderson and Personne, 1967a) and a Mg^{++} activated ATPase at the interface of the coarse fibers, on the spokes surrounding the central tubules and on the surface of the central tubules (this study) may

serve to mediate contraction of the axonemal elements during motility. An ATP-dephosphorylating enzyme on the membrane surrounding the centriolar derivative may facilitate energy transfers related to the initiation and regulation of flagellar wave underlying axonemal contraction. ATPase activity associated with the periaxonemal membrane fraction (Gibbons, 1965) and in the space surrounding the peripheral doublets (Daems *et al.*, 1963; Lansing and Lamy, 1961) may provide energy for ion transmission across the periflagellar membrane.

THE ENERGY CONVERTER

The close association of the paracrystalline mitochondrial derivative and flagellum suggests a functional relationship (André, 1962; Anderson and Personne, 1967b). Available cytochemical and biochemical evidence indicates that this middle piece contains the enzymes, co-factors and intermediates for Krebs cycle and oxidative phosphorylation. The exclusive localization of glycogen in the major helix (Personne and André, 1964; André, 1965), segregation of oxidative enzymes, particularly dehydrogenases (Personne and Anderson, 1967), and the existence of some of the intermediates of the electron transport chain (Ritter and André, unpublished results) strongly suggests that the paracrystalline structure is the energy converter for the kinetic and metabolic functions of the spermatozoon. The energy derived from oxidative-phosphorylation may directly contribute to the motor function of the spermatozoa. The extreme structural and chemical compartmentalization of the middle piece is probably related to the efficient transport of high-energy phosphorylated intermediates to the kinetic apparatus, as well as to facilitate the translocation of ADP and Pi used in the resynthesis of ATP. Although intermediates of the electron transport chain are known to exist in concentrated state, the ultrastructural localization of these compounds has not yet been accomplished. It has however been suggested that the crystalline portion of the mitochondrial derivative may represent subunits of the respiratory chain that are arranged in repetitive arrays (André, 1963, 1965; Personne, 1965).

CONCLUSIONS

Specific metabolic pathways, substrates, intermediates and enzymes bear complex structural and functional relationship to each other within the

framework of the mitochondrial derivative of *Helix*. This chemical compartmentalization appears to be related to the glycogenolytic, glucogenic, glycolytic, respiratory and kinetic functions of the spermatozoon. The level of interactions between these complex metabolic pathways must be regulated by delicate physiological mechanisms including systems of enzymes and cofactors, substrates, activators and inhibitors, repressors and derepressors, feedback, etc. The possible roles and interaction of phosphatases in metabolism of spermatozoa, particularly how they are related to the motor functions of these cells are indicated in Plate VII and discussed below.

Glycogen stores, exclusively located in the major helix of the spermatozoon represents an endogenous substrate pool that is used for the production of energy. The existence of phosphorylase activity in this region indicates that intermediates for glycolytic and respiratory pathways are produced as a result of glycogen degradation. Thus the phosphorylase reaction could represent the rate-limiting step in endogenous glycolysis in spermatozoa of *Helix*.

The presence of G6Pase activity in these sperm indicates that glycogenolytic pathways are at play in their internal metabolism. Glucose-6-phosphate control by G6Pase and substrate inhibition of this enzyme by free glucose may represent secondary regulatory mechanisms for glycogen metabolism and glycolysis. Production of free glucose by G6Pase could be a chief factor in regulating the relative rates of glycogenesis and glycogenolysis.

The end-products of glycolysis, for example pyruvate, seem to be oxidized by enzymes of the tricarboxylic acid cycle that are present in the secondary helix (Personne and Anderson, 1967). Movement of electrons as a result of dehydrogenase activity, associated with the phosphorylation of ADP may account for the production of ATP. Speculations have been offered suggesting that the crystalline portion of the middle piece is composed of regular repeating units of the electron transport chain (André, 1965; Personne, 1965), supported by spectrophotometric evidence that most of the intermediates of the respiratory chain are present and active (Ritter and André, unpublished results). ATP generated by the respiratory pathway appears to be supplied directly to the kinetic apparatus where it is catalyzed by a specific Mg^{++} activated (perhaps also trypsin-stimulated) ATPase to provide energy for metabolism and motility. Furthermore the Mg^{++} activated ATPase is an integral part of the axoneme, specific to the fibers surrounding the central tubules, to the central tubules themselves and to the interface of adjacent coarse fibers.

A multienzyme system, consisting of several specific and non-specific phosphatases, also occupy the matrix between the axonemal

elements. Intermediates of glycogen degradation reactions, for example glucose-6-phosphate, plus other phosphate esters that are fed into the milieu of kinetic elements are further dephosphorylated by these phosphatases. In this manner the free phosphate pool and ADP that will be utilized in the resynthesis of ATP is maintained. These axonemal phosphatases could therefore act as pacemakers regulating the ATP, ADP and P_i levels, which in turn may be rate-limiting for glycolysis and respiration. Indeed, respiration of mitochondria may either be controlled by the level of P_i and ADP (Chance and Williams, 1956; Racker, 1965) or by the phosphate potential, function of the ratio of ATP/ADP, P_i (Klingenberg and Schollmeyer, 1960).

The role of non-specific acid phosphatase activity in the axial filament is not known, however the hydrolytic function of this enzyme is well documented (de Duve, 1959; Novikoff, 1965). In addition to hydrolysis of several phosphate esters in this region, acid phosphatase may inactivate other enzymes in its vicinity. Thus it could perhaps act in the regulation and control of the relative activities of phosphatases and of hydrolyzable substrate levels in the flagellum.

Acknowledgements

We express appreciation to Dr. H. Clauser, Institut de Biochimie, Faculté des Sciences, Orsay, France, for his constructive criticism of the manuscript.

SUMMARY

By electron microscope cytochemistry, some phosphatases have been localized in spermatids and spermatozoa of the snail *Helix aspersa*. In young spermatids, acid phosphatase end-product appears within cisternae of the Golgi apparatus, endoplasmic reticulum and in some mitochondria. The detection of acid phosphatase activity on the manchette coincides with the dismantling of this system of microtubules and the degeneration of the residual cytoplasm. These findings suggest that acid phosphatase participates in the controlled autolysis of the manchette and in the release of the mature spermatozoon from the cytoplasm. In the mature spermatozoon, enzyme end-product is absent from the mitochondrial derivative but appears in the axial filament.

In mature spermatozoa, intense glucose-6-phosphatase activity end-product is present in the axial filament and in the secondary helix of the mitochondrial derivative. Glucose-6-phosphatase may participate actively in glycolytic and glycolytic pathways in these spermatozoa. Thiamine pyrophosphatase activity appears on the periflagellar membrane and on the surface of the crystalline mitochondrial derivative.

Mg^{++} activated ATPase activity is relegated to the axial filament of unfixed, trypsin-treated motile spermatozoa. ATPase end-product appears on the central

tubules, in the vicinity of the filaments surrounding the central tubules, and at the interface of peripheral flagellar doublets and coarse fibers. ATPase activity in the flagellum may serve to mediate contraction of the axonemal elements during motility.

Phosphatases in the axial filament and in specific compartments of the mitochondrial derivative of spermatozoa of *Helix aspersa* may participate in the dephosphorylation of a wide variety of substrates during metabolism and motility.

RÉSUMÉ

Quelques enzymes phosphatasiques ont été localisées à l'aide de la cytochimie ultra-structurale dans les spermatides et dans les spermatozoïdes de l'Escargot *Helix aspersa*. Dans les jeunes spermatides, la phosphatase acide apparaît dans les sacculs de l'appareil de Golgi, dans le reticulum endoplasmique et dans quelques mitochondries. La détection de l'activité de la phosphatase acide sur la manchette coïncide avec le démantèlement du système des microtubules et la dégénérescence du cytoplasme résiduel. Ces constatations suggèrent que la phosphatase acide participe à l'autolyse contrôlée de la manchette et à la libération des spermatozoïdes mûrs du cytoplasme. Dans les spermatozoïdes mûrs, la réaction finale de l'enzyme est absente du dérivé mitochondrial mais elle apparaît dans le filament axial.

Chez les spermatozoïdes mûrs, une intense activité glucose-6-phosphatasique est présente sur le filament axial et sur l'hélice secondaire du dérivé mitochondrial. On peut penser que la glucose-6-phosphatase participe activement aux voies métaboliques du glycogène et du glucose dans les spermatozoïdes. Une activité thiamine-pyrophosphatasique est décelée sur la membrane périflagellaire et à la surface du dérivé cristallin des spermatozoïdes.

La réaction de l'ATPase activée par le Mg^{++} est limitée au filament axial des spermatozoïdes non-fixés, encore mobiles après un traitement à la trypsine. Le produit final est visible sur les tubules centraux, dans le voisinage des filaments entourant ces tubules, et aux interfaces des doublets et des « coarse fibers ». L'ATPase dans le flagelle peut servir de médiateur dans la contraction des éléments de l'axonème pendant le mouvement.

Les phosphatases de l'axonème et des différents compartiments de dérivé mitochondrial des spermatozoïdes de l'Escargot peuvent participer à la déphosphorylation de substrats très variés au cours du métabolisme et du mouvement.

BIBLIOGRAPHIE

1. ANDERSON W.A., 1967a. Cytodifferentiation of spermatozoa in *Drosophila melanogaster* : the effect of elevated temperature on spermiogenesis. *Molec. Gen. Genetics*, **99**, 257-273.
2. ANDERSON W.A., 1967b. Localization of phosphatases in sea urchin sperm. Unpublished results.

3. ANDERSON W.A. and ELLIS R.A., 1965. Ultrastructure of *Trypanosoma lewisi* : flagellum, microtubules and the kinetoplast. *J. Protozool.*, **12**, 483-499.
4. ANDERSON W.A. and ELLIS R.A., 1967. Cytodifferentiation of the crayfish spermatozoon : acrosome formation, transformation of mitochondria and development of microtubules. *Z. Zellforsch.*, **77**, 80-94.
5. ANDERSON W.A. and PERSONNE P., 1967a. Localization of some phosphatases in spermatids and spermatozoa of *Helix*. *J. Microscopie*, **6**, 35a.
6. ANDERSON W.A. and PERSONNE P., 1967b. The fine structure of neck region of spermatozoa of *Helix aspersa*. *J. Microscopie*, **6**, 1033-1042.
7. ANDERSON W.A., WEISSMAN A. and ELLIS R.A., 1967. Cytodifferentiation during spermiogenesis in *Lumbricus terrestris*. *J. Cell Biol.*, **32**, 11-26.
8. ANDRÉ J., 1962. Contribution à la connaissance du chondriome : étude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogénèse. *J. Ultrastructure Res.*, suppl. 3, 1-185.
9. ANDRÉ J., 1963. Some aspects of specialization in sperm. In *General physiology of cell specialization*. D. Mazia and A. Tyler ed., McGraw-Hill Book Co., New York, 91-115.
10. ANDRÉ J., 1965. Quelques données récentes sur la structure et la physiologie des mitochondries : Glycogène, particules élémentaires, acides nucléiques. *Arch. Biol., Liège*, **76**, 277-304.
11. ASHWORTH C.T., LUIBEL F.J. and STEWART S.C., 1963. The fine structural localization of Adenosine triphosphatase in the small intestine, kidney and liver of the rat. *J. Cell Biol.*, **17**, 1-18.
12. BEAUFAY H. and de DUVE C., 1957. Altération précoce des lysosomes au cours de la nécrose massive d'un lobe hépatique. *Arch. Inter. Physiol. Biochem.*, **65**, 156-157.
13. BEAUFAY H., BENDAL D.S., BAUDHUIN P. and de DUVE C., 1959. Tissue fractionation studies. 12, Intracellular distribution of some deshydrogenases, alkaline deoxyribonuclease and iron in rat liver tissue. *Biochem. J.*, **73**, 623-628.
14. BISHOP D.W., 1962. Reactivation of extracted sperm cell models in relation to the mechanism of motility. In *Spermatozoon Motility*. D.W. Bishop ed. Am. Assoc. Advance Sci. Press, Washington, D.C., 251-268.

15. BRACHET J., DECROLY-BRIERS M. and HOYEZ J., 1958. Contribution à l'étude des lysosomes au cours du développement embryonnaire. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, 2039-2048.
16. BURGOS M.H. and FAWCETT D.W., 1955. Studies on the fine structure of the mammalian testis. I. The differentiation of the spermatids in the cat. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **1**, 287-300.
17. BURSTONE M.S., 1962. *Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms*. Academic Press Inc., New York and London, 270.
18. CHANCE B. and WILLIAMS S.R., 1956. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advan. Enzymol.*, **17**, 65.
19. CHIQUOINE A.D., 1953. The distribution of glucose-6-phosphatase in the liver and kidney of the mouse. *J. Histochem. Cytochem.*, **1**, 429-435.
20. CLELAND K.W. and Lord ROTHSCILD, 1959. The bandicoot spermatozoon: an electron microscope study of the tail. *Proc. Royal Soc., Series B*, **50**, 24-42.
21. DAEMS W.T., PERSIJN J.P. and TATES A.D., 1963. Fine structural localization of ATPase activity in mature sperm of *Drosophila melanogaster*. *Exp. Cell Res.*, **32**, 163.
22. De DUVE C., 1959. The function of intracellular hydrolases. *Exp. Cell Res.*, suppl. **7**, 169-182.
23. FAWCETT D.W., 1958. The structure of the mammalian spermatozoon. *Intern. Rev. Cytol.*, **7**, 195-234.
24. GIBBONS I.R., 1965. Chemical dissection of cilia. *Arch. Biol., Liège*, **76**, 317-352.
25. GOLDFISCHER S., ESSNER E. and NOVIKOFF A.B., 1964. The localization of phosphatase activities at the level of ultrastructure. *J. Histochem. Cytochem.*, **12**, 72-95.
26. GOMORI G., 1952. *Histochemistry. Principles and practice*. The University of Chicago Press, Chicago, 193.
27. GORDON M. and BARNETT R.J., 1967. Fine structural cytochemical localizations of phosphatase activities of rat and guinea pig. *Exp. Cell Res.*, **48**, 395-411.
28. GRASSÉ P.P., CARASSO N. and FAVARD P., 1956. Les ultrastructures cellulaires au cours de la spermiogenèse de l'escargot. (*Helix pomatia* L.). *Ann. Sci. Nat. Zool.*, **11**, 339-380.
29. HERS H.G., BERTHET J., BERTHET L. and de DUVE C., 1951. Le système hexose - phosphatasique. III. Localisation intra-cellulaire des ferments par centrifugation fractionnée. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 21-41.

30. HOFFMANN-BERLING H., 1959. The role of cell structures in cell movements. In *Cell, Organization and Milieu*. D. Rudnick ed. The Ronald Press Co., New York, 45-62.
31. HUGON J. and BORGERS M., 1967. Submicroscopic localization of the alkaline phosphatase activity in the duodenum of the rat. *Exp. Cell Res.*, **45**, 698-702.
32. HUXLEY H.E., 1965. Structural evidence concerning the mechanism of contraction in striated muscle. In *Muscle*. Pergamon Press, Oxford, 3-28.
33. KLINGENBERG M. and SCHOLLMAYER P., 1960. Zur reversibilitat der oxidativen phosphorylierung. *Bioch. Z.*, **333**, 335-350.
34. KREBS E.G. and FISCHER E.H., 1962. Molecular properties and transformations of glycogen phosphorylase in animal tissues. *Advances in Enzymol.*, **24**, 263-290.
35. LANSING A.I. and LAMY F., 1961. Localization of ATPase in rotifer cilia. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **11**, 498-501.
36. MANN T., 1945. Metabolism of semen. I. General aspects. Occurrence and distribution of cytochrome, certain enzymes and coenzymes. *Biochem. J.*, **39**, 451-458.
37. MANN T., 1967. Sperm Metabolism. In *Fertilization*. C.B. Metz and A. Monroy ed., Academic Press Inc., New York and London, **1**, 99-116.
38. MEEK G.A. and BRADBURY S., 1963. Localization of thiamine pyrophosphatase activity in the Golgi apparatus of a mollusc, *Helix aspersa*. *J. Cell Biol.*, **18**, 73-85.
39. MOLBERT E., DUSPIVA F. and VON DEIMLING O.H., 1960. Die histochemische Localisation der Phosphatase in der Tubulus Epithelzelle der Mäuseniere im elektronen Mikrosokpischen Bild. *Histochemie*, **2**, 5-22.
40. NAGANO T., 1965. Localization of adenosine triphosphatase activity in the rat sperm tail as revealed by electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **25**, 101-112.
41. NELSON L., 1958. Cytochemical studies with the electron microscope. I. Adenosinetriphosphatase in rat spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 634-641.
42. NELSON L., 1959. Adenosinetriphosphatase of *Mytilus* spermatozoa. II. Effects of sulfhydryl reagents, temperature and inorganic pyrophosphatase. *Biol. Bull.*, **117**, 327-339.
43. NELSON L., 1962. Cytochemical aspects of spermatozoan motility. In *Spermatozoan Motility*, D.W. Bishop ed. Am. Assoc. Advance. Sci. Press, Washington, D.C. 171-187.

44. NELSON L., 1967. Sperm motility. In *Fertilization*, C.B. Metz and A. Monroy ed. Academic Press Inc., New York and London, **1**, 27-97.
45. NOVIKOFF A.B. and GOLDFISCHER, 1961. Nucleosidediphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **47**, 802-810.
46. OTERO-VILARDEBO L.R., LANE L.R. and GODMAN G.C., 1963. Demonstration of mitochondrial ATPase activity in formalin-fixed colonic epithelial cells. *J. Cell Biol.*, **19**, 647-652.
47. PADYKULA H. and HERMAN E., 1955. Specificity of histochemical method for adenosine triphosphatase. *J. Histochem. Cytochem.*, **3**, 170-195.
48. PADYKULA H. and GAUTHIER G.F., 1963. Cytochemical studies of adenosine triphosphatases in skeletal muscle fibers. *J. Cell Biol.*, **18**, 87-107.
49. PARSONS D.F., WILLIAMS G.R., THOMPSON W., WILSON D.W. and CHANCE B., 1967. Improvements in the procedure for purification of mitochondrial outer and inner membrane. In *Mitochondrial Structure and Compartmentalization*, E. Quagliariello, S. Papa, E.C. Slater, J.M. Tager ed. Adriatica Editrice, Bari, 29-70.
50. PERSONNE P., 1965. Étude cytochimique du dérivé mitochondrial du spermatozoïde de la Testacelle: recherche des protéines et des lipides. *J. Microscopie*, **4**, 627-641.
51. PERSONNE P., 1966. Rôle des mitochondries dans le métabolisme du glycogène. *J. Microscopie*, **5**, 70 a.
52. PERSONNE P. and ANDRÉ J., 1964. Existence de glycogène mitochondrial dans le spermatozoïde de la Testacelle. *J. Microscopie*, **3**, 643-650.
53. PERSONNE P. and ANDERSON W.A., 1967. Recherche des deshydrogénases par cytochimie ultrastructurale. *J. Microscopie*, **6**, 35 a.
54. PERSONNE P. and ANDERSON W.A. Unpublished results.
55. RACKER E., 1965. *Mechanism in Bioenergetics*. Academic Press Inc., New York and London, 226.
56. RALL T.W. and SUTHERLAND E.W., 1961. The regulatory role of adenosine-3', 5'-phosphate. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **26**, 347-354.
57. REYNOLDS E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **17**, 208-212.
58. RITTER C. and ANDRÉ J. (unpublished). Cytochromes and hemoglobin in sperm of *Helix aspersa* (Muller).

59. SATIR P., 1965. Structure and function in cilia and flagella. *Proto-plasmalogica*, **3**, 1-52.
60. SATIR P. and CHILD F.M., 1963. The microscopy of ATP reactivated ciliary models. *Biol. Bull.*, **125**, 390.
61. SCARPELLI D.G. and CRAIG E.L., 1965. The fine localization of nucleoside triphosphatase activity in the retina of the frog. *J. Cell Biol.*, **17**, 279-288.
62. SIEKEVITZ P., LOW H., ERNSTER L. and LINDBERG O., 1958. On a possible mechanism of the adenosinetriphosphatase of liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **29**, 378-391.
63. STETTEN D. and STETTEN M.R., 1960. Glycogen metabolism. *Physiol. Revs.*, **12**, 505-537.
64. SUTHERLAND E.W. and RALL T.W., 1958. Fractionation and characterization of a cyclic adenosine ribonucleotide formed by tissue particles. *J. Biol. Chem.*, **232**, 1077-1091.
65. TERNER C., 1962. Oxidative and biosynthetic reactions in spermatozoa. In *Spermatozoan Motility*, D.W. Bishop ed. Am. Assoc. advance. Sci. Press, Washington, D.C., 89-98.
66. TIBBS J., 1962. Adenosine triphosphatase and acetylcholinesterase in relation to sperm motility. In *Spermatozoan Motility*. D.W. Bishop ed. Am. Assoc. Advance. Sci. Press, Washington, D.C., 233-250.
67. TICE L.W. and BARNETT R.J., 1962. Fine structural localization of adenosine triphosphatase activity in heart muscle myofibrils. *J. Cell Biol.*, **15**, 401-416.
68. TICE L.W. and BARNETT R.J., 1963. The fine structural localization of some testicular phosphatases. *Anat. Rec.*, **147**, 43.
69. VON DEIMLING O., MOLBERT E. and DUPISVA F., 1960. Electronmikroskopischer Nachweis eines glukose - 1 - phosphat-spaltenden Enzyms im Herzmuskel der Albinoratte. *Beit. Path. Anat.*, **123**, 127-143.
70. WACHSTEIN M. and MEISEL E., 1957. Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Am. J. Clin. Path.*, **27**, 13-23.
71. WACHSTEIN M., BRADSHAW M. and ORTIZ J.M. 1962. Histochemical demonstration of mitochondrial adenosine triphosphatase activity in tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.*, **10**, 65-74.
72. WEBER R., 1957a. The cathepsin activity in tails of *Xenopus* larvae during growth and metamorphosis. *Rev. Suisse Zool.*, **64**, 326-336.
73. WEBER R., 1957b. On the biological function of cathepsin in tail tissue of *Xenopus* larvae. *Experientia*, **13**, 153-155.

MÉMOIRES ORIGINAUX

74. WU R., 1959. Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. *J. Biol. Chem.*, **234**, 2806-2810.
75. YASUZUMI G. and LEE K.J., 1966. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. XVI. The microtubules structure and sites of thiamine pyrophosphatase activity in premature sperm of the Japanese crayfish. *Z. Zellforsch.*, **73**, 384-404.

Manuscrit reçu le 8 février 1968.

Plate I. — Acid Phosphatase Activity.

Fig. a. — In an early spermatid of *Helix*, lead phosphate deposits indicating acid phosphatase activity are shown in the perinuclear space, in cisternae of the endoplasmic reticulum (*arrows*) and Golgi apparatus (*G*), and in the matrix of the mitochondria; $\times 30,000$.

Fig. b. — A transverse section through the middle piece of an immature spermatozoon is shown here. Enzyme-reaction product is present on the surface-plasmalemma (*arrow*), in the axial filament (*F*), and is absent from the principal helix, the crystalline mitochondrial derivative (*M*), and from the cytoplasmic background; $\times 75,000$.

Fig. c. — In this micrograph, enzyme reaction product occupies the cisternae of endoplasmic reticulum (*arrows*) surrounding the manchette microtubules. (*M*) mitochondrial derivative; $\times 75,000$.

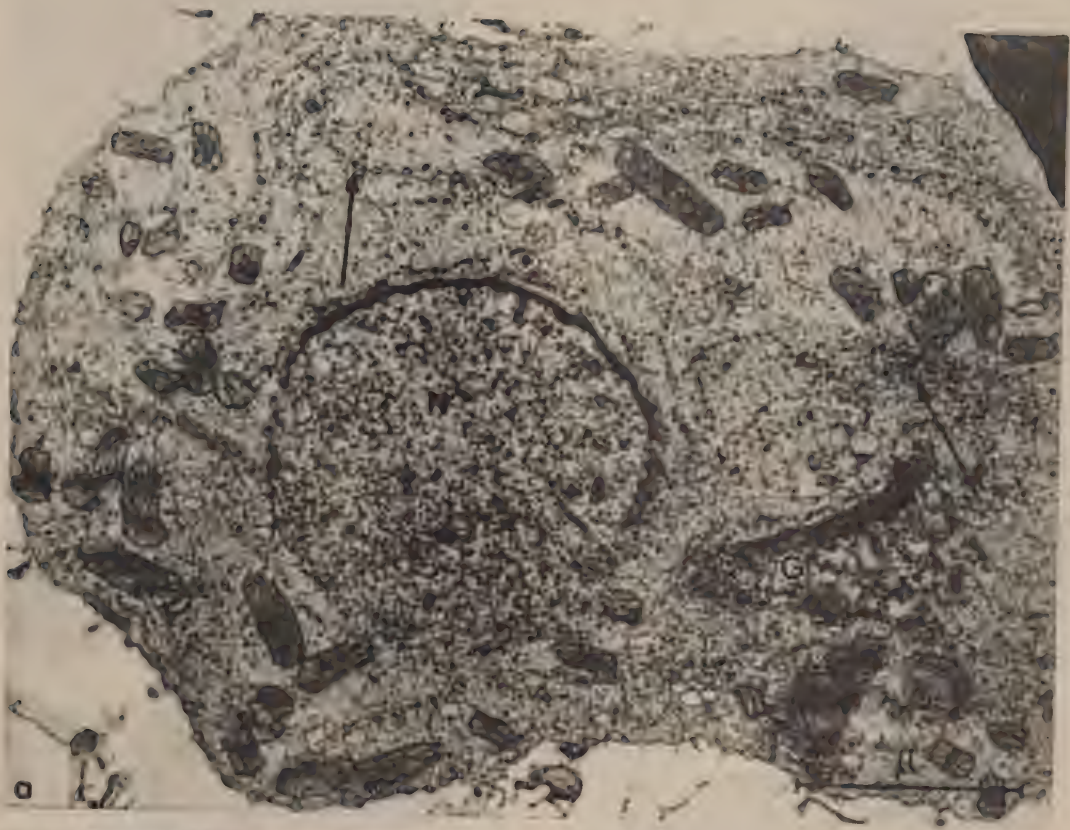


Plate II. — Acid phosphatase activity.

Fig. a. — In a transverse section through the middle piece of an immature spermatozoon, lead phosphate deposits are present on the manchette microtubules (*arrows*) and between the central and peripheral fibers of the flagellum (*F*). (*M*) mitochondrial derivative; $\times 80,000$.

Fig. b. — Acid phosphatase activity end-product (*arrows*) is shown on the manchette and on the degenerating residual cytoplasm of an immature spermatozoon. (*F*) axial filament; $\times 80,000$.

Fig. c. — Lead phosphate deposits occupy the region between the central tubules and peripheral coarse fibers of the flagellum (*F*) in a mature spermatozoon; $\times 80,000$.

Fig. d. — Lead phosphate deposits are absent from the middle piece of a control specimen incubated in substrate-free medium; $\times 80,000$.

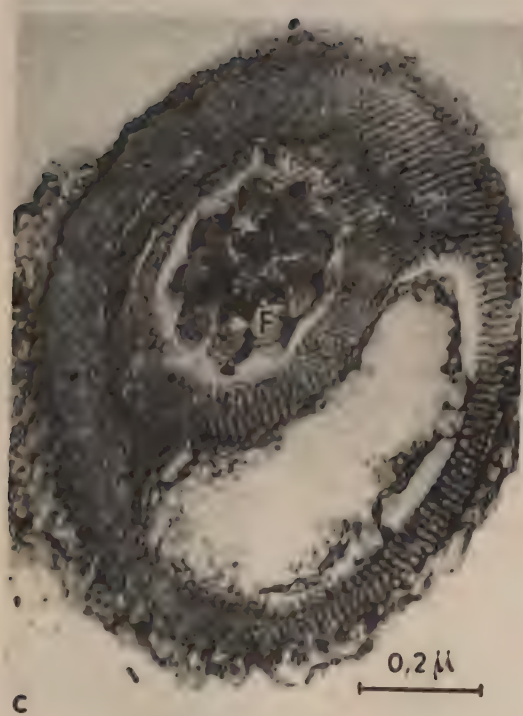
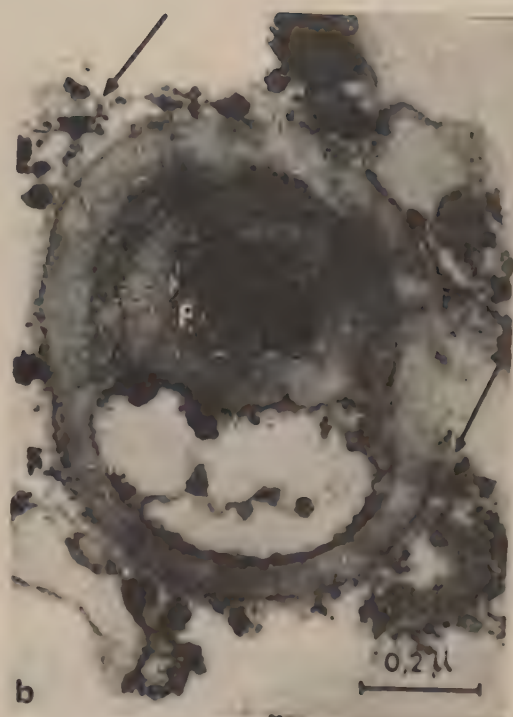


Plate III. — Glucose-6-Phosphatase activity.

Fig. a. — Intense glucose-6-phosphatase activity is shown in the flagellum (*F*) and on the membranes of the secondary mitochondrial helix (*SH*). Lead phosphate deposits are also shown on the surface of the middle piece; $\times 75,000$.

Fig. b. — A transverse section through the middle piece of a spermatozoon incubated in substrate-free medium. Lead phosphate deposits are shown on the surface of the sperm. (*SH*) secondary helix; $\times 75,000$.

Fig. c. — A longitudinal section through the neck of a spermatozoon is shown here. Glucose-6-phosphatase activity is evident in the flagellum (*F*) and in the secondary helix (*SH*). (*N*), nucleus; $\times 65,000$.

Fig. d. — In a control specimen, enzyme-reaction product is absent from the flagellum and secondary helix. Non-specific deposits are seen on the surface of the sperm. (*N*) nucleus $\times 65,000$.

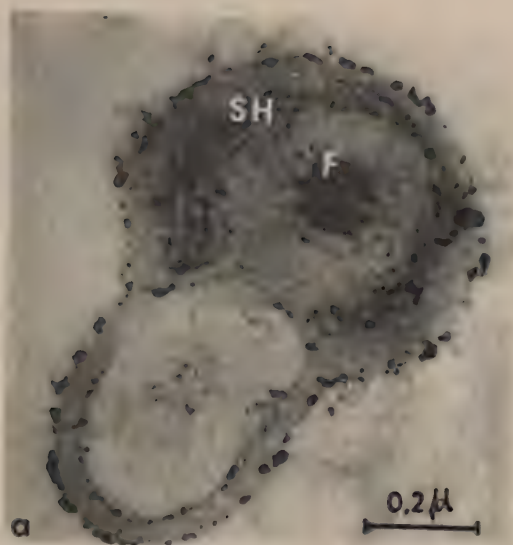


Plate IV

Fig. a. — A transverse section through the middle piece of a mature spermatozoon is shown. Lead phosphate deposits, indicating thiamine pyrophosphate activity, are present on the external membrane (*mb*), on the surface of the mitochondrial crystal and on the periflagellar membrane (*arrow*). (*F*) flagellum; $\times 90,000$.

Fig. b. — A transverse section of a specimen incubated in medium lacking thiamine pyrophosphate is illustrated. Enzyme end-product is absent; $\times 85,000$.

Fig. c. — A transverse section through the middle piece of a mature spermatozoon is shown. Mg^{++} stimulated ATPase activity appears at the interface (*arrow*) of coarse fibers (*cf*) and around the central tubules of the flagellum. (*SH*) secondary helix; $\times 140,000$.

Fig. d. — In a longitudinal section through a coarse fiber (*cf*), lead phosphate deposits are distributed at intervals on its surface; $\times 150,000$.

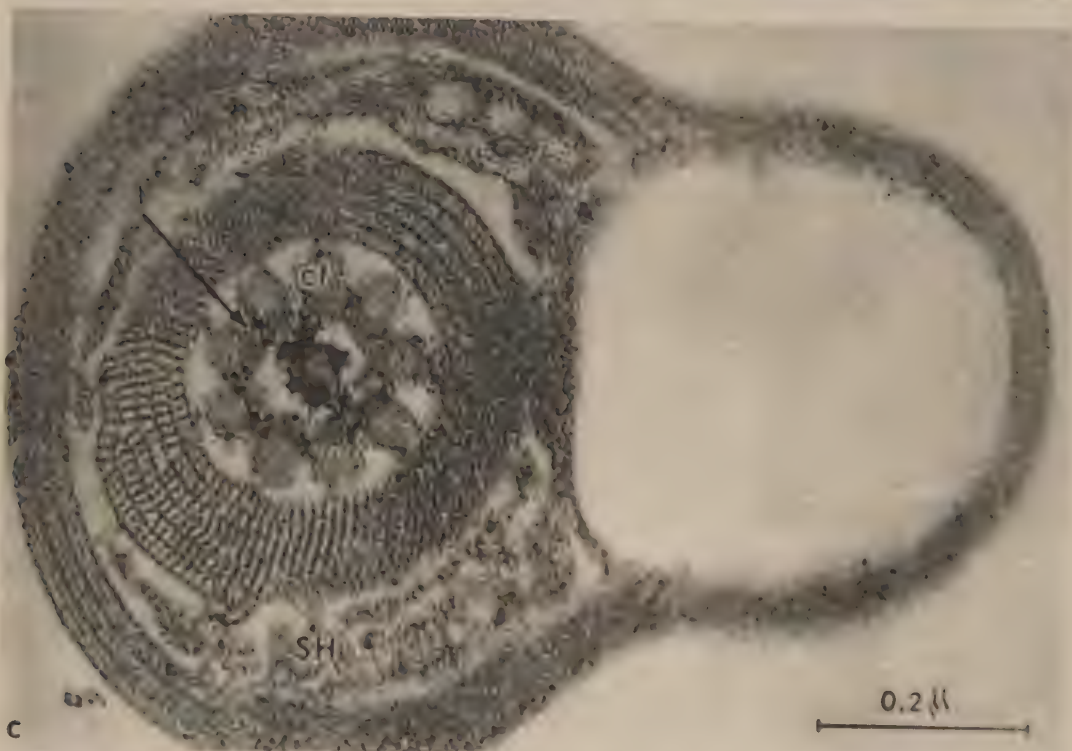
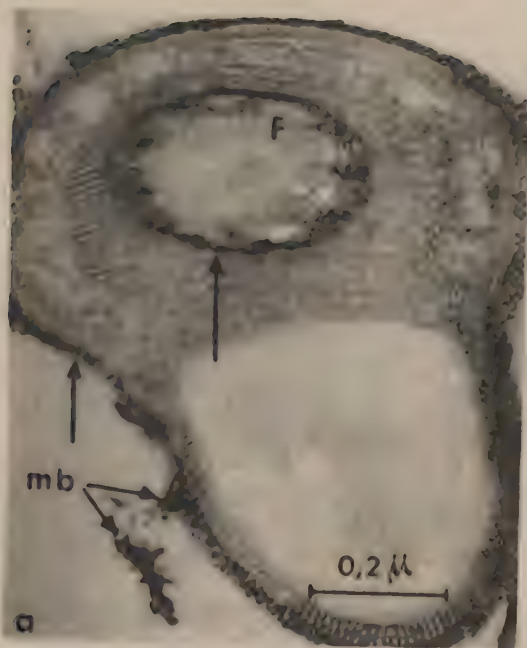


Plate V

Fig. a. — After 15 mins incubation, Mg^{++} stimulated ATPase activity is shown on the surface of the central tubules (*arrow*) and in the interspace between the central tubules and coarse fibers (*cf*). The crystal (*C*) shows no end-product; $\times 160,000$.

Fig. b. — In this longitudinal section, ATPase activity end product appears in the axial filament of the spermatozoon; no lead phosphate deposits are present on the crystal. (*cf*) coarse fiber; $\times 160,000$.

Fig. c. — The absence of lead phosphate deposits is seen in this control specimen. After post-incubation treatment in OsO_4 , portions of the central sheath (*arrow*) are seen in the interspace between the coarse fibers and central tubules; $\times 170,000$.

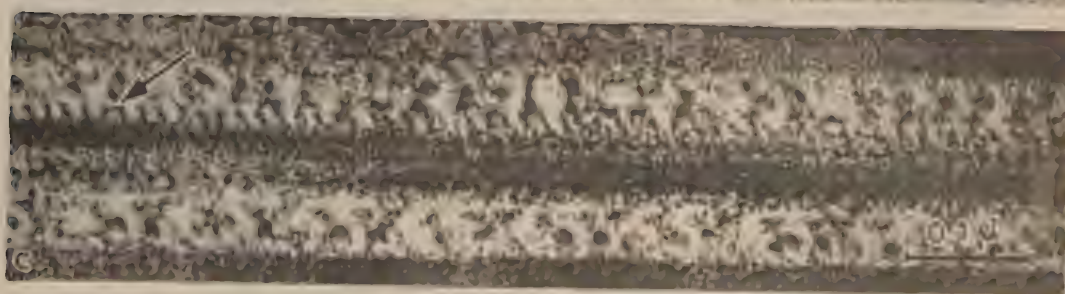
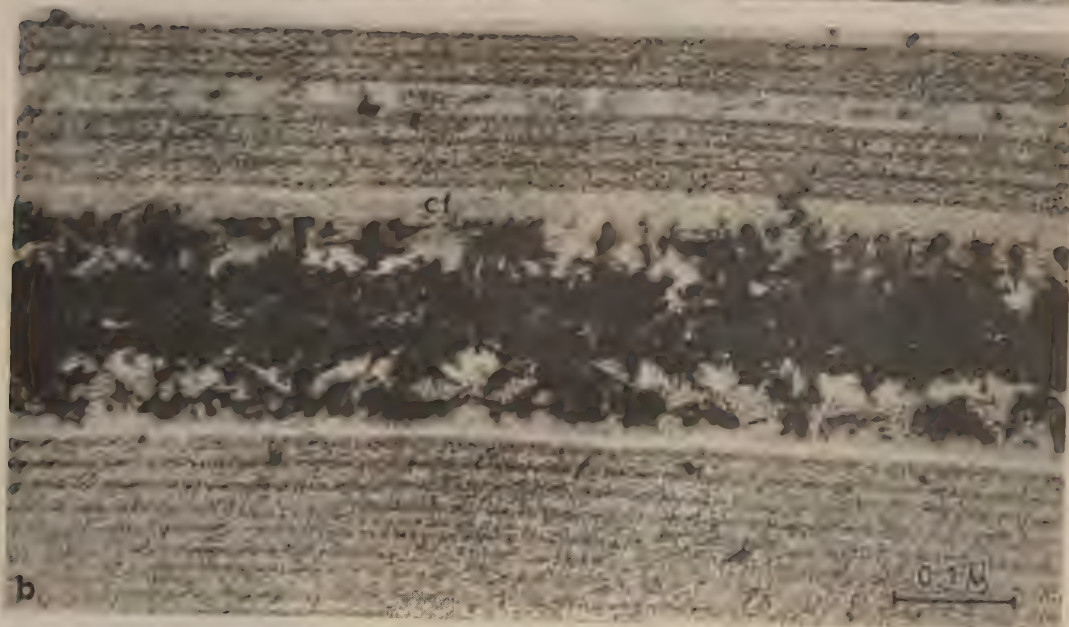


Plate VI

Fig. a. — After 30 mins incubation, Mg^{++} activated ATPase activity end product totally occludes the axial filament in this longitudinal section of a mature spermatozoon. Lead phosphate deposits are absent from the major helix (*PH*) but some non-specific deposits are present on the outer surface of the crystal; $\times 140,000$.

Fig. b. — In a transverse section, lead phosphate deposits are shown in the axial filament between the coarse fibers (*arrow*) and surrounding the central tubules. The major helix (*PH*) shows no enzyme reaction product; $\times 90,000$.

Fig. c. — No enzyme activity is seen in the middle piece of a control specimen; $\times 80,000$.

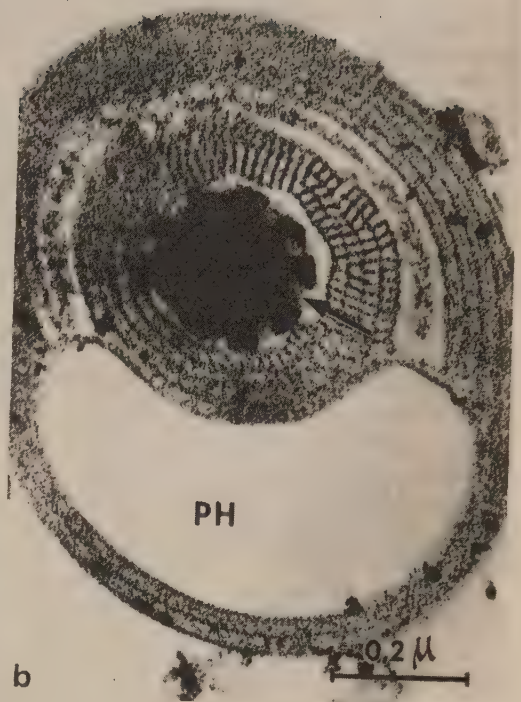
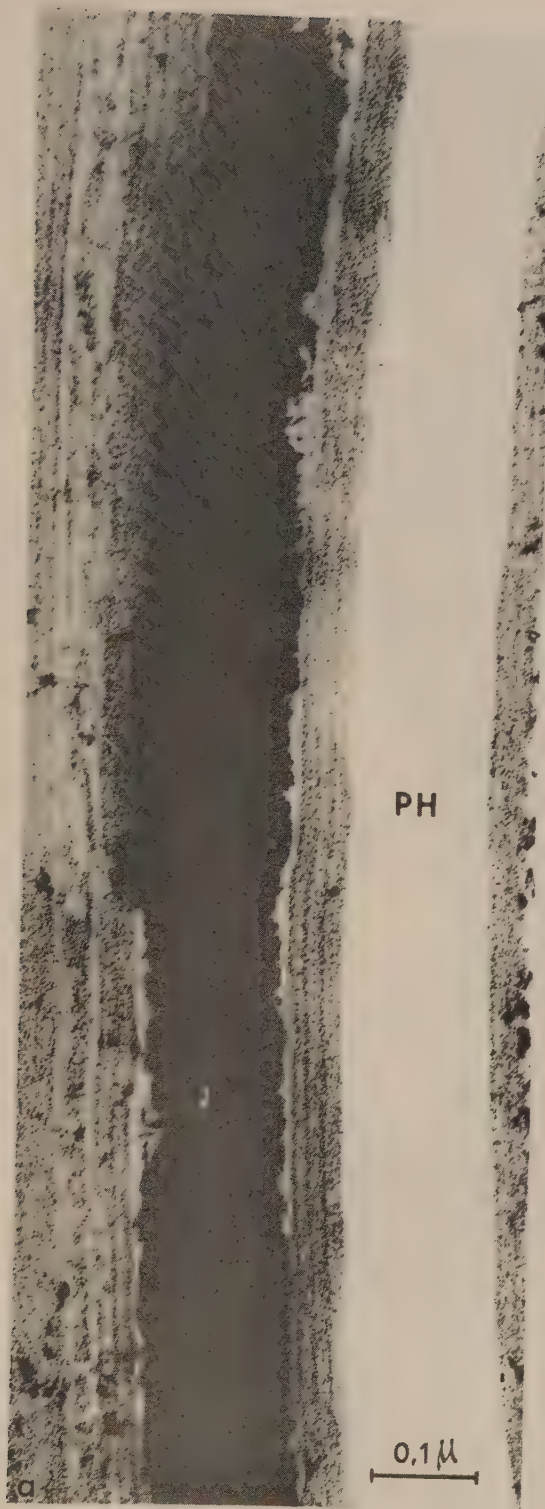
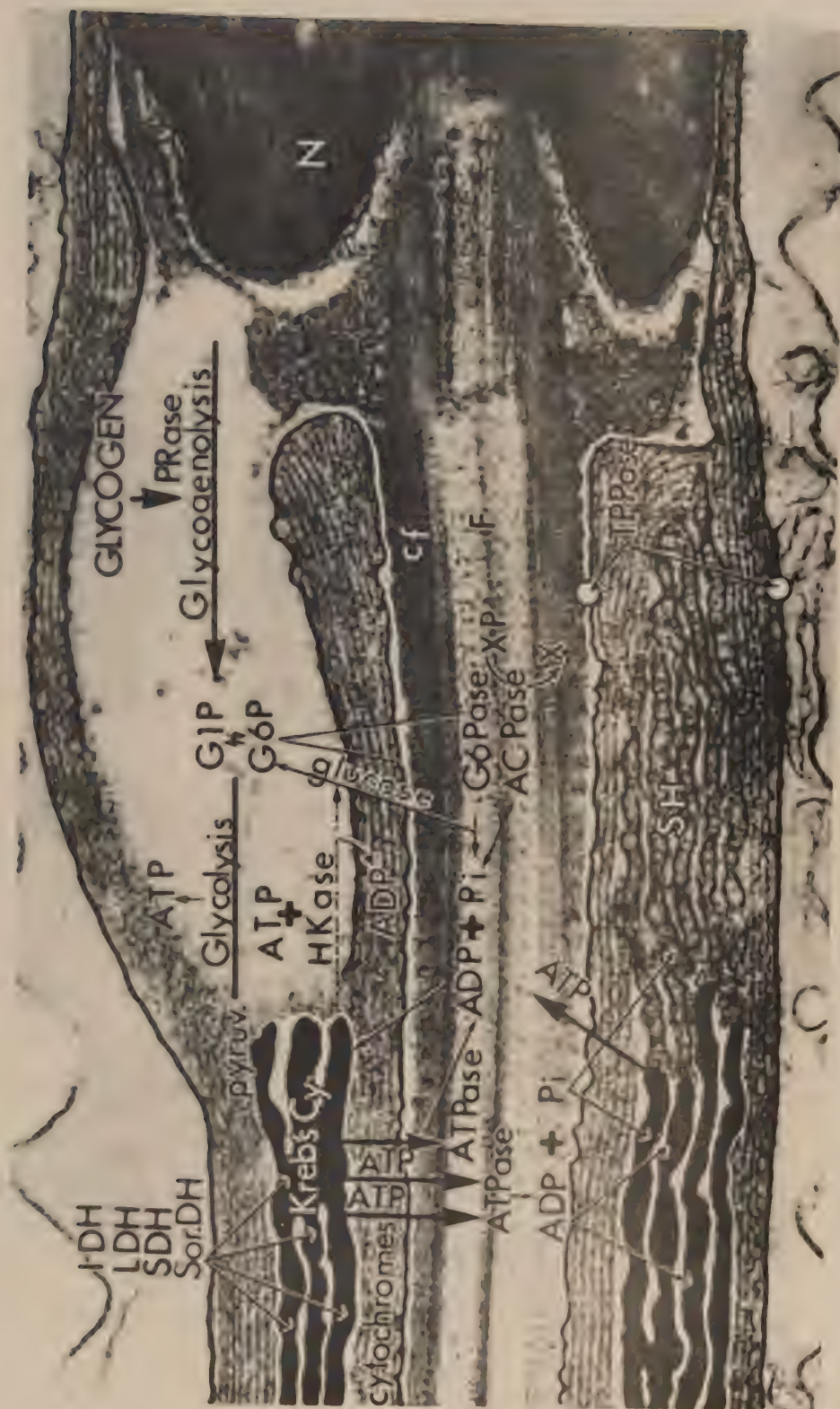


Plate VII

This is a diagrammatic representation showing the enzyme localizations and possible inter-relationships in the middle piece of the mature sperm of *Helix*.

Abbreviations : *ACPase*, acid phosphatase; *ADP*, adenosine diphosphate; *ATP*, adenosine triphosphate; *ATPase*, adenosine triphosphatase; *G1P*, glucose-1-phosphate; *G6P*, glucose-6-phosphate; *G6Pase*, glucose-6-phosphatase; *HKase*, hexokinase; *Pi*, inorganic phosphate; *PRase*, phosphorylase; *TPPase*, thiamine pyrophosphatase; *XP*, unspecific phosphate esters; *pyruv*, pyruvate; *IDH*, isocitric dehydrogenase; *LDH*, lactic dehydrogenase; *SDH*, succinic dehydrogenase; *Sor. DH*, sorbitol dehydrogenase; *cf*, coarse fiber; *F*, flagellum; *N*, nucleus; *SH*, secondary helix.



THE CYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF SORBITOL DEHYDROGENASE ACTIVITY IN SPERMATOOZOA OF *HELIX ASPERSA*

Winston A. ANDERSON* and Paul PERSONNE**

*Laboratoire de Biologie Cellulaire 4***, Faculté des Sciences, 91 - Orsay et
Laboratoire de Biologie Animale, Collège Scientifique Universitaire, 80 - Amiens*

INTRODUCTION

The fine structure and organization of the mitochondrial derivative and its relationship to the connecting piece and axoneme of *Helix aspersa* were recently described (Personne, 1965 ; Anderson and Personne, 1967). The mitochondrial derivative itself consists of 2 main compartments ; the region named the "principal helix" contains particulate glycogen (Personne and André, 1964 ; André, 1965) while the "secondary helix" is a narrow membrane-bounded zone that contains fine granular material. A highly organized paracrystalline region forms an inner zone around the axial filament and separates the major and secondary helices.

Sorbitol dehydrogenase appears in the testes of some vertebrates and invertebrates (Bishop, 1967 ; personal communication). The cytochemical localization of sorbitol dehydrogenase activity in mitochondria

* Supported by a Postdoctoral Fellowship (PF - 342) from the American Cancer Society, U.S.A.

** Ce travail fait partie d'une thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles devant être soutenue à la Faculté des Sciences d'Orsay.

*** This work has been partially supported by grants from the C.N.R.S. (L.A. 86 and R.C.P. 21), and the D.R.M.E. (Contract 500 : 67).

of spermatozoa suggests that this enzyme may function metabolically. In the presence of NAD and sorbitol dehydrogenase, sorbitol is oxidized to fructose with the formation of $\text{NAD} + \text{H}^+$ (Mann, 1967). Sorbitol dehydrogenase may therefore play an important role in the maintenance of NAD-NADH₂ balance in spermatozoa. In this investigation, sorbitol dehydrogenase activity (SDH) is demonstrated in some compartments of the middle piece of *Helix* spermatozoa.

MATERIALS AND METHODS

DETECTION OF SORBITOL DEHYDROGENASE ACTIVITY

Mature spermatozoa were obtained from the hermaphroditic duct of *Helix aspersa*. The sperm were isolated in cold 0.5 M. Tris buffer at pH 8.2 ; the buffer contained 5 mg/ml trypsin. Unfixed cells and cells fixed in 2 % cacodylate buffered glutaraldehyde were rinsed in cold Tris buffer (pH 8.2) for 30 mins at 4 °C in order to remove endogenous substrates (e.g. lactic acid). Since prefixation in glutaraldehyde has a suppressive effect on SDH activity, chemically-fixed cells were not used. After rising the cells were incubated for periods ranging from 15 mins to 3 hours in 2 changes of the following medium at 37 °C :

Tris buffer	0.5 M (pH 8.2)	4.2 ml
Sorbitol	1 M	0.3 ml
Nitro-BT	1 mg/ml	3.0 ml
KCN	0.01 M	0.1 ml
NAD	6 mg/ml	1.5 ml
Distilled water		0.9 ml

Control specimens were incubated in sorbitol-free medium or in medium containing sorbitol but lacking NAD. Subsequent to incubation the cells were rinsed for 5-10 mins in 0.1 M sodium cacodylate buffer containing 5 % sucrose and fixed for 30-60 mins in 2 % glutaraldehyde buffered to pH 7.2 with 0.1 M sodium cacodylate.

ELECTRON MICROSCOPE TECHNIQUES

After post-fixation in glutaraldehyde cells were immediately placed in two 2½ min changes of 70 % acetone-water solution, followed by two 5 min changes in 90 % acetone. The cells were then placed for 10 mins in two changes of propylene oxide, for 30 mins in a 1 : 1 (v/v) mixture of propylene oxide and epon-araldite mixture, and finally embedded in pure epon-araldite mixture containing 1.5 % DMP-30 (Anderson and Ellis, 1965). Unstained thin sections and sections stained in both uranyl acetate and lead stains were examined with a Siemens Elmiskop 1 A electron microscope.

OBSERVATIONS

The major compartments of this paracrystalline mitochondrial derivative are shown in Pl. I, fig. *a*.

When unfixed spermatozoa are incubated for 60 mins in complete medium, formazan deposits indicating SDH activity are specifically relegated to the coarse fibers of the flagellum and to the "secondary helix" of the mitochondrion (Pl. I, fig. *b* and *c*). The extremely fine formazan deposits appear chiefly in the matrix within the "secondary helix". Opaque deposits are absent from the axonemal cylinder, the "principal helix", and the crystalline region of the derivative. Enzyme reaction product does not appear in control specimens incubated in sorbitol-free medium containing NBT (Pl. I, fig. *d*).

The opacity of the formazan deposits is increased when cells are incubated for periods as long as 3 hours. The localization of the deposits remains the same (Pl. II).

DISCUSSION

The unequivocal localization of formazan, indicating dehydrogenase activity in the "secondary helix" of the mitochondrial derivative of pulmonate sperm is of considerable interest (Personne and Anderson, 1968). These findings suggest the presence of functional Krebs cycle enzymes within a region corresponding to the matrix of typical mitochondria. Dehydrogenases in this compartment appear to be functionally

related to the utilization of oxidizable substrates derived from the glycolytic pathways and to the transfer of electrons into the electron transport chain. The full complement of functional intermediates of the electron transport chain are known to be present in sperm of *Helix* (Ritter and André, unpublished). The localization of glycogen and glycogen-degradation enzymes in the "principal helix" (Personne and André, 1964 ; Personne, 1966), Krebs cycle enzymes in the secondary helix (Personne and Anderson, 1967, 1968), several phosphatases in the flagellum (Anderson and coll., 1968) and the probable presence of the cytochromes and oxidative phosphorylation enzymes in the crystalline framework (André, 1965) indicate the parallel structural and chemical compartmentalization of the derivative. Such a high degree of order may be related to the functional efficiency of these enormous cells.

Glycogen is the chief storage-form and may represent the main source of energy for metabolism and motility in spermatozoa of *Helix*. The existence of phosphorylase and glucose-6-phosphatase activity in these sperm, imply the presence of glycogenolytic and glucose producing pathways. The fate of glucose is not known, but it has been speculated that glucose re-enters the glycolytic pathway by way of the hexokinase reaction and at the expense of ATP (Anderson *et al.*, 1968). However, other pathways of glucose utilization may exist. Among these may be the conversion of glucose to polyols such as glycerol and sorbitol. These polyols could serve as precursors for phospholipid biosynthesis, as energy reserves, and/or be transformed into intermediates utilized by the glycolytic pathway. Thus in the presence of $\text{NADPH} + \text{H}^+$, SDH (aldose reductase) catalyzes the reduction of glucose to sorbitol and is responsible for the following reaction (Chino, 1960) :

1. $\text{Glucose} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{NADP}^+ + \text{sorbitol}$. The data also indicate that SDH (ketose reductase) in the presence of NAD^+ , catalyzes the oxidation of sorbitol to fructose (Mann, 1967) ;

2. $\text{Sorbitol} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{fructose} + \text{NADH}^+ + \text{H}^+$. SDH, like other dehydrogenases linked to NAD or NADP, may be important in maintaining the balance of $\text{NAD}^+ : \text{NADH}_2$ used in these reactions. SDH may also be involved in the conversion of glucose to sorbitol and in the reconversion of sorbitol to other sugars and lipids.

Acknowledgements

We express appreciation to Dr. David W. Bishop, Medical College of Ohio at Toledo, Toledo, Ohio, U.S.A., for his helpful suggestions and for reading this manuscript.

SUMMARY

By means of electron microscope cytochemistry, sorbitol dehydrogenase activity (SDH) is localized within the paracrystalline mitochondrial derivative of the spermatozoa of *Helix aspersa*. When unfixed spermatozoa are incubated for 60 mins to 3 hours, formazan deposits indicating SDH activity are specifically relegated to coarse fibers of the axoneme and to the secondary helix of the mitochondrion. In the snail sperm, SDH may be involved in the utilization of glucose. It may thus be involved in the conversion of glucose to sorbitol, and also in the oxidation of sorbitol to fructose. Like other dehydrogenases linked to NAD or NADP, SDH may be involved in maintaining the balance of NAD : NADH₂ within the mitochondrion.

RÉSUMÉ

La localisation de l'activité sorbitol déshydrogénasique (SDH) à l'intérieur du dérivé mitochondrial du spermatozoïde d'*Helix aspersa* a été recherchée par cytochimie ultrastructurale. Après incubation pendant 60 mins à 3 heures des spermatozoïdes non fixés, les dépôts de formazan révélant l'activité SDH sont spécifiquement localisés sur les fibres striées de l'axonème et sur l'hélice secondaire du dérivé mitochondrial. Dans le spermatozoïde d'*Helix*, la SDH peut intervenir dans l'utilisation du glucose. Elle peut aussi jouer un rôle dans la transformation du glucose en sorbitol et dans l'oxydation du sorbitol en fructose. Comme les autres déshydrogénases liées au NAD ou au NADP, la SDH peut être impliquée dans le maintien de l'équilibre NAD/NADH₂ à l'intérieur de la mitochondrie.

BIBLIOGRAPHY

1. ANDERSON W.A. and ELLIS R.A., 1965. Ultrastructure of *Trypanosoma lewisi* : flagellum, microtubules and the kinetoplast. *J. Protozool.*, **12**, 483-499.
2. ANDERSON W.A. and PERSONNE P., 1967. The fine structure of the neck region of spermatozoa of *Helix aspersa*. *J. Microscopie*, **7**, 1033-1042.
3. ANDERSON W.A., PERSONNE P. and ANDRÉ J., 1968. Chemical compartmentalization of *Helix* spermatozoa. *J. Microscopie*, **7**, 367-390.
4. ANDRÉ J., 1965. Quelques données récentes sur la structure et la physiologie des mitochondries : glycogène, particules élémentaires, acides nucléiques. *Arch. Biol.*, Liège, **76**, 277-304.

5. BISHOP D.W., 1967. Significance of testicular sorbitol dehydrogenase (SDH). *J. Gen. Physiol.*, 50, 2504.
6. CHINO H., 1960. Enzymatic pathways in the formation of sorbitol and glycerol in the diapausing egg of the silkworm, *Bombyx mori*. I. - On the polyol dehydrogenase. *J. Insect Physiol.*, 5, 1-15.
7. MANN T., 1967. Sperm Metabolism. In : *Fertilization*, Metz, C.B. and Monroy A., ed., Academic Press, New York and London, 1, 99-116.
8. PERSONNE P., 1965. Etude cytochimique du dérivé mitochondrial du spermatozoïde de la Testacelle : recherche des protéines et des lipides. *J. Microscopie*, 4, 629-641.
9. PERSONNE P., 1966. Rôle des mitochondries dans le métabolisme du glycogène. *J. Microscopie*, 5, 70 a.
10. PERSONNE P. and ANDERSON W.A., 1967. Recherche de déshydrogénases par cytochimie ultrastructurale. *J. Microscopie*, 6, 35 a.
11. PERSONNE P. and ANDRÉ J., 1964. Existence de glycogène mitochondrial dans le spermatozoïde de la Testacelle. *J. Microscopie*, 3, 643-650.
12. PERSONNE P. and ANDERSON W.A., 1968. Compartimentage des activités enzymatiques dans le spermatozoïde de certains Mollusques Gastéropodes. 1. Localisation des déshydrogénases. *J. Cell Science*, in press.
13. RITTER C. and ANDRÉ J. Cytochromes and hemoglobin in sperm of *Helix aspersa* (Muller) (unpublished).

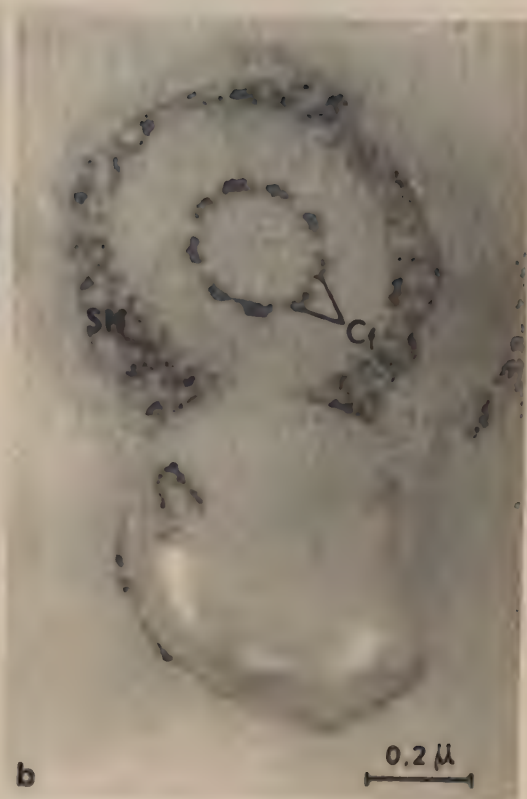
Manuscrit reçu le 11 juillet 1968.

Plate I

Fig. a. — A transverse section through the mitochondrial derivative of a spermatozoon is illustrated in this micrograph. The "principal" (P) and "secondary" (SH) helices, the crystalline regions (C) and the axial cylinder (A) are depicted ; $\times 75,000$.

Fig. b and c. — Formazan deposits indicating SDH activity are relegated to the secondary helices (SH) and to the coarse fibers (Cf) of the axial cylinder. In this experiment, unfixed cells were incubated in complete medium for 60 mins and were postfixed in glutaraldehyde for 30 mins ; $\times 70,000$.

Fig. d. — A transverse section through the middle piece of a sperm that was incubated for 60 mins in sorbitol free medium is illustrated. Formazan deposits are absent ; $\times 60,000$.



P. PERSONNE (*) et W. A. ANDERSON (**)

ÉTUDE COMPARÉE DES ÉVOLUTIONS MITOCHONDRIALES AU COURS DE LA SPERMATOGENÈSE CHEZ QUELQUES GASTÉROPODES

SUMMARY. — The study of mitochondria during spermatogenesis and in the spermatozoon allow the spermatozoons of Gastropoda to be classified in three types. One, similar to that of the Bivalva, possess a simple corona of free mitochondria at the nuclear basis. This primitive type characterizes a modality of external fertilization, and appears in some Prosobranchia. In the other Prosobranchia, in Opisthobranchia and in Pulmonata, the fertilization is internal and a middle piece is formed. The structure of the mitochondrial derivative enclosed in this middle piece and the nature of the modifications undergone by the mitochondria characterize the two other types of spermatozoons. Each of them is apparently specific of a sub-class. In Prosobranchia, i.e. Streptoneures, the cristae, always present in the mitochondrial derivative, are reorganized perpendicularly to the axis of the mitochondria that they wholly partition. In Euthyneures (Pulmonata, Opisthobranchia), the main part of the cristae disappears and a new crystalline structure fills the intermembranar space.

RIASSUNTO. — Lo studio dei mitocondri durante la spermatogenesi e negli spermatozoi permette di classificare lo spermatozoo dei Gasteropodi in 3 tipi. Uno, simile a quello dei Bivalvi, possiede una semplice corona di mitocondri liberi alla base del nucleo. Questo tipo primitivo caratterizza la fecondazione esterna, ed appare in alcuni Prosobranchi. Negli altri Prosobranchi, negli Opistobranchi e nei Polmonati, la fecondazione è interna ed è presente il « middle piece ». La struttura dei mitocondri e le modificazioni da essi subite caratterizzano gli altri 2 tipi di spermatozoi. Ciascuno di essi è apparentemente specifico di una sottoclasse. Nei Prosobranchi, p. es., Streptoneuri le creste, sempre presenti nei derivati mitocondriali, sono organizzate perpendicolarmente all'asse dei mitocondri.

Negli Eutineuri (Polmonati, Opistobranchi) scompare la maggior parte delle creste e una struttura cristallina riempie lo spazio tra le membrane.

INTRODUCTION

GRASSÉ et Coll., (1956) chez *Helix pomatia*, ANDRÉ (1962) chez *Testacella*, TAHMISIAN (1964) chez *Helix aspersa* ont montré que chez ces Gastéropodes Pulmonés les mitochondries de la spermatide fusionnent en un

(*) Laboratoire de Biologie Animale, Faculté des Sciences, 80. Amiens France, Laboratoire de Biologie Cellulaire 4, Faculté des Sciences. Orsay France. Ce travail a bénéficié de l'aide du Centre National de la Recherche Scientifique ERA 174, et de la Direction des Recherches et Moyens d'Essais (contrat 513/68).

(**) Laboratories of Human Reproduction and Reproductive Biology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts U.S.A.

complexe périflagellaire et subissent de profondes modifications structurales. La majeure partie des crêtes disparaît et une formation nouvelle, cristalline, s'organise. KAYE (1958) a décrit chez le Prosobranch *Viviparus contectoides* une évolution différente: les mitochondries conservent leurs crêtes jusque dans le spermatozoïde. Il en est de même chez les Prosobranches *Cipangopaludina malleata* (YASUZUMI et Coll., 1958, 1959) et *Nucella lapillus* (WALKER et MACGREGOR, 1968).

Il nous a paru intéressant de rechercher si de telles différences dans l'évolution mitochondriale au cours de la spermatogenèse pouvaient avoir une valeur phylogénétique. Dans ce but, nous avons observé et comparé le comportement du chondriome pendant la spermatogenèse chez les espèces suivantes:

PROSOBRANCHES	OPISTHOBRANCHES	PULMONES
<i>Gibbula cineraria</i> (L.)	<i>Aplysia punctata</i> (Cuv.)	<i>Helix aspersa</i> (MÜLLER)
<i>Patella vulgata</i> (L.)		<i>Helix pomatia</i> (L.)
<i>Littorina obtusata</i> (L.)		<i>Limnea palustris</i> (MÜLLER)
<i>Littorina littorea</i> (L.)		<i>Planorbis</i>
<i>Purpura lapillus</i> (L.)		<i>Arion aggericola</i> (Mab.)
<i>Paludina fasciata</i> (MÜLLER)		

OBSERVATIONS

I. Les Prosobranches:

A. *Gibbula* et *Patella*.

Ces Prosobranches marins ont une fécondation externe et leurs spermatozoïdes sont considérés comme primitifs dans la classification de FRANZEN (1956). Dans la jeune spermatide, les mitochondries globuleuses au nombre de 5 à 6 se groupent à la base du noyau autour des deux centrioles (Fig. 1 et 3). Au cours de la maturation de la spermatide, les crêtes mitochondriales se dilatent et la matrice se condense. Dans le spermatozoïde, les mitochondries de la couronne périflagellaire restent indépendantes. Leurs crêtes très dilatées, au contenu clair, compriment la matrice qui constitue des rubans flexueux très denses (Fig. 2). Dans ces mitochondries très peu modifiées, les structures membranaires internes conservent leur activité cytochrome oxydasique jusque dans le spermatozoïde. L'axonème de ces spermatozoïdes est dépourvu de fibres externes pleines.

B. *Paludina*, *Purpura*, *Littorina*.

La spermatogénèse se déroule de façon à peu près identique chez ces trois genres. Comme l'a montré KAYE (1958) chez *Viviparus*, les mitochondries au nombre d'une vingtaine dans le spermatocyte I fusionnent dans la jeune spermatide où il n'y a plus que 4 à 6 chondriosphères. Celles-ci se groupent autour du flagelle à la base du noyau (Fig. 4 et 5). Les membranes externes des mitochondries adjacentes confluent, réunissant les choondriosphères en un anneau mitochondrial périflagellaire (Fig. 5). Dans celui-ci les mitochondries gardent néanmoins leur individualité.

L'anneau mitochondrial s'allonge et s'enroule autour du flagelle (Fig. 6). Au cours de cette phase, les crêtes se réorientent et deviennent perpendiculaires à l'axe des mitochondries enroulées autour du flagelle (Figs. 7, 10 et 11). Chez le Pourpre (Fig. 7) et chez la Littorine, les crêtes sont peu nombreuses. Chez la Paludine, les crêtes très nombreuses ont une disposition périodique. Elles constituent des disques alternant régulièrement avec des disques matriciels (Figs. 10 et 11) (KAYE, 1958). Dans la gaine mitochondriale du spermatozoïde, la cytochrome oxydase reste localisée à la surface de la membrane interne (Figs. 8 et 9).

II. *Les Pulmonés*.

Chez tous les Pulmonés que nous avons étudiés, la spermatogénèse se déroule de façon semblable. Dans le jeune spermatocyte, les mitochondries, sont de courts bâtonnets aux crêtes longitudinales caractéristiques (GRASSÉ et Coll., 1956; ANDRÉ, 1962). Au cours de la croissance des spermatocytes, certaines mitochondries deviennent globuleuses et les crêtes se disposent de manière concentrique. D'autres mitochondries s'allongent; certaines de leurs crêtes se dilatent et compriment la matrice qui se condense. Le contenu clair des crêtes dilatées dénommé pseudomatrice par ANDRÉ (1962) renferme de fins filaments d'un diamètre de 70 à 90 Å (Fig. 12). Ces mitochondries allongées s'enroulent autour du flagelle (Fig. 3) puis se soudent en un seul corps mitochondrial (Fig. 14). Les filaments dans la pseudomatrice ne sont plus visibles et des amas d'un matériel finement granulaire sont apparus (Fig. 14). La fusion des mitochondries est complète, crêtes, matrices, membranes externes et membranes internes confluent. Le corps mitochondrial ainsi constitué ne comprend plus qu'un compartiment matriciel limité par ce qui subsiste de la membrane interne et entouré par la psuedomatrice volumineuse. Dans celle-ci des globules de 90 Å de diamètre apparaissent et s'organisent en bandes concentriques le long de la membrane mitochondriale externe (Fig. 15). Ces globules remplissent progressivement tout le volume pseudomatriciel, pour constituer un cristal (Fig. 16). Dans le cytoplasme résiduel, les mitochondries qui n'ont pas participé à la constitution de la pièce intermédiaire, subissent la même évolution (Fig. 17). Du point de vue des enzymes mito-

chondriales, la cytochrome oxydase⁽¹⁾ située à la surface des crêtes dans le spermatocyte (Fig. 19) se localise au niveau de la pseudomatrice dans la spermatide (Fig. 18) et au niveau du cristal dans le spermatozoïde (Fig. 20). Dans la région antérieure de la pièce intermédiaire, le cristal mitochondrial outre le compartiment matriciel est creusé d'un compartiment qui est rempli de glycogène dans le spermatozoïde mature (PERSONNE et ANDRÉ, 1964). La présence et l'agencement de ces compartiments sculptent des nervures à la surface du cristal. Chez l'Escargot, il n'existe qu'une seule nervure (Fig. 16) dans laquelle est logé un canal de glycogène. Chez la Planorbe où deux hélices contiennent du glycogène, il y a deux nervures. Chez la Limnée, deux canaux de glycogène et dans la région antérieure quatre digitations du compartiment matriciel déterminent sept nervures; dans la région médiane où le compartiment matriciel est lisse, il n'y a que deux nervures (Fig. 21). Chez la Testacelle les trois hélices correspondent l'une à un canal de glycogène et les deux autres à la matrice condensée dans deux canaux. (ANDRÉ, 1962; PERSONNE et ANDRÉ, 1964).

III. *Les Opisthobranches.*

Nous ne disposons que d'observations fragmentaires sur la spermatogénèse de ces Gastéropodes. Chez l'Aplysie, comme chez les Pulmonés, un cristal s'élaborerait dans l'espace pseudomatriciel du dérivé mitochondrial. Dans ce dérivé, les mitochondries, fusionnées en un manchon périflagellaire, resteraient individualisées.

CONCLUSIONS

Chez les Prosobranches nous avons observé, comme FRANZEN (1955), deux types de spermatozoïdes. Dans le type primitif, qui correspond à un mode de fécondation externe (FRANZEN, 1956), les mitochondries se groupent en un anneau à la base du noyau. Dans cet anneau, les mitochondries restées indépendantes ont des crêtes dilatées et une matrice condensée. Cette disposition des mitochondries se classe dans le type II A de la revue d>IDELMAN (1967). On la retrouve chez les Bivalves (GALTSOFF et PHILPOTT, 1959;

(1) Nous fondant sur le travail de SELIGMAN et Coll. (1968) nous avons utilisé la réaction DAB pour rechercher la cytochrome oxydase. Depuis BEARD et NOVIKOFF 1969 (J. Cell. Biol., 42, 501), NOVIKOFF et GOLDFISCHER 1969 (J. Histochem. Cytochem., 17, 675) ont montré que l'oxydation du DAB par les mitochondries se produisait aussi bien sur la membrane externe que sur la membrane interne. Ces résultats conduisent NOVIKOFF et Coll. à étendre à d'autres cytochromes la spécificité de la réaction DAB des mitochondries. Dans notre matériel, l'oxydation du DAB n'est donc peut-être pas due à la seule action de la cytochrome oxydase mais à l'action de certains cytochromes. Des expériences sont en cours pour tenter de préciser ce point.

PASTELLS et DE HARVEN, 1962), les Échinodermes (AFZELIUS, 1955), chez des Polychètes (COLWIN et COLWIN, 1961) et des Poissons (BILLARD, 1969; MATTEI, 1969), dont la fécondation est aussi externe. Comme dans d'autres groupes (FRANZEN, 1956; BILLARD, 1969), une pièce intermédiaire contenant un dérivé mitochondrial plus ou moins long se constitue dans le spermatozoïde des espèces à fécondation interne. La formation de ce dérivé mitochondrial suit un schéma commun à de nombreux groupes. Les mitochondries, dont les crêtes dilatées compriment une matrice dense, s'enroulent autour du flagelle. Néanmoins, la fusion des mitochondries en un seul ensemble périflagellaire et une certaine réorganisation de l'architecture des crêtes confèrent une structure assez caractéristique au manchon mitochondrial des Prosobranches à fécondation interne. Dans ce manchon, l'abondance en crêtes est variable selon les espèces. Le nombre des espèces étudiées étant trop limité et la physiologie de ces spermatozoïdes insuffisamment connue, ce critère ne peut, pour l'instant, avoir de valeur systématique. FRANZEN (1955, 1956) a observé au contraste de phase que la pièce intermédiaire du spermatozoïde des Prosobranches était différente de celle des Pulmonés et des Opisthobranches. Nos résultats confirment ces observations et montrent que le dérivé mitochondrial des Pulmonés, et probablement celui des Opisthobranches, comprend un volumineux cristal intermembranaire. Cette structure mitochondriale nouvelle qui n'existe pas chez les Prosobranches ou Streptoneures n'a été décrite dans aucun autre groupe. Elle semble caractéristique de la pièce intermédiaire du spermatozoïde des Euthyneures: Opisthobranches, et Pulmonés. Celle-ci présenterait d'autre part des caractères propres à chacune des 2 sous-unités. Chez les Opisthobranches les mitochondries, simplement réunies comme chez les Prosobranches, par la confluence de leurs membranes externes, garderaient leur individualité. Chez les Pulmonés, les mitochondries se confondent toutes en un corps mitochondrial unifié. La surface de celui-ci est sculptée de nervures hélicoïdales qui correspondent à des canaux logés dans le cristal. Le nombre de ces nervures et la nature des canaux, différents pour chacun des genres étudiés, constituent des caractères apparemment spécifiques.

BIBLIOGRAPHIE

- AFZELIUS B. A. (1955) — *The fine structure of the sea urchin spermatozoa as revealed by the electron microscope*. « Z. Zellforsch. Mikrosch. Anat. », 42, 134-148.
- ANDRÉ J. (1962) — *Contribution à la connaissance du chondriome: étude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogenèse*. « J. Ultrastruct. Res. », suppl. 3, 1-185.
- BILLARD (1969) — *Spermiogenèse comparée de quelques Téléostéens. International Symposium on comparative spermatology*. Rome Sienne.
- COLWIN A. L. et COLWIN L. H. (1961) — *Fine structure of the spermatozoon of Hydroides hexagonous (Annelida) with special references to the acrosomal region*. « J. Biochem. Biophys. Cytol. », 10, 211-230.
- FRANZEN Å. (1955) — *Comparative morphological investigation into the spermiogenesis among Mollusca*. « Zool. Bidragfran Uppsala », 30, 399-456.

- FRANZÉN Å. (1956) — *On spermiogenesis, morphology of the spermatozoon, and biology of fertilization among invertebrates*. « Zool. Bidr. Uppsala », 31, 355-482.
- GALTSOFF P. S. et PHILPOTT D. E. (1959) — *Electron microscope study of the sperm of Crassostrea virginica*. « Biol. Bull. », 117, 386.
- GALTSOFF P. S. et PHILPOTT D. E. (1960) — *Ultrastructure of the spermatozoon of the oyster Crassostrea virginica*. « J. Ultrastr. Res. », 3, 241-253.
- GRASSÉ P. P., CARASSO N. et FAVARD P. (1956) — *Les ultrastructures cellulaires au cours de la spermiogenèse de l'Escargot Helix pomatia. Evolution des chromosomes, du chondriome, de l'appareil de Golgi*. « Ann. Sci. Natur. Zool. », 18, 339-380.
- IDELMAN S. (1967) — *Données récentes sur l'infrastructure du spermatozoïde*. « Ann. Biol. » 6, 113-190.
- KAYE J. S. (1958) — *Changes in the fine structure of mitochondria during spermatogenesis*. « J. Morphol. », 102, 347-399.
- MATTEI X. (1969) — *International Symposium on comparative spermatology*. Rome-Sienne.
- PASTEELS J. J. et DE HARVEN E. (1962) — *Etude au microscope électronique du spermatozoïde d'un mollusque bivalve, Barnea candida*. « Arch. Biol. Belg. », 73, 445-463.
- PERSONNE P. et ANDRÉ J. (1964) — *Existence de glycogène mitochondrial dans le spermatozoïde de la Testacelle*. « J. Microscopie », 3, 643-650.
- SELIGMAN A. M., KARNOVSKY M. J., WASSERKRUG H. L. et HANKER J. S. (1968) — *Non-droplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymeric osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB)*. « J. Cell Biol. », 38, 1-14.
- TAHMISIAN T. N. (1964) — *On orderly domains of particles associated with cytomembranes during spermiogenesis in Helix aspersa*. « Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. », 65, 25-31.
- YASUZUMI G. et TANAKA H. (1958) — *Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. Research on the spermatozoa dimorphism in a pond snail, Cipangopaludina malleata*. « J. Biophys. Biochem. Cytol. », 4, 621-632.
- YASUZUMI G., TANAKA H., TEZUKA O. et NAKANOS S. (1959) — *The ultrastructure of organelles appearing in spermatids and nutritive cells of Cipangopaludina malleata*. « Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. », 50, 632-643.
- WALKER M. et MAC GREGOR H. C. (1968) — *Spermatogenesis and the structure of the mature sperm in Nucella lapillus (L)*. « J. Cell Science », 3, 95-104.

LÉGENDES DES FIGURES

Fig. 1 à 3. — Prosobranches à fécondation externe.

Fig. 1. — Gibbule. Spermatozoïde en cours de maturation. Le noyau (*N*) est surmonté d'un acrosome volumineux (*A*). A la base du noyau les 2 centrioles (*Cd* et *Cp*) sont entourés par une couronne de mitochondries globuleuses (*M*). Celles-ci ont une matrice dense (*m*) et des crêtes (*c*) peu dilatées. $\times 45.000$.

Fig. 2. — Gibbule. Spermatozoïde mature. La condensation du matériel nucléaire est achevée. Dans les mitochondries, les crêtes (*c*) dilatées et ondulées compriment la matrice (*m*) qui constitue un réseau de lames flexueuses très denses. $\times 45.000$.

Fig. 3. — Patelle. Spermatozoïde en cours de maturation. $\times 45.000$.

Cd = centriole distal, *Cp* = centriole proximal, *N* = noyau, *M* = mitochondrie.

Fig. 4 à 11. — Prosobranches à fécondation interne.

Fig. 4. — Littorine. Très jeune spermatide coupée transversalement à la base du noyau (*N*). 6 mitochondries (*M*), de structure normale, sont groupées autour du flagelle (*F*) $\times 45.000$.

- Fig. 5. — Pourpre. Spermatide coupée transversalement à la base du noyau (*N*). Les mitochondries (*M*) groupées autour du flagelle se réunissent en un seul manchon, les membranes externes des mitochondries adjacentes confluent (flèches). $\times 45.000$.
- Fig. 6. — Pourpre — Coupe tangentielle d'une spermatide montrant l'allongement et l'enroulement de la gaine mitochondriale (*M*). *N* = noyau. $\times 45.000$.
- Fig. 7. — Pourpre — Spermatozoïde coupé obliquement au niveau de la pièce intermédiaire. Les mitochondries enroulées autour du flagelle sont réunies en un ensemble unique, que limite une membrane mitochondriale externe commune (*me*). Les crêtes (*c*) peu nombreuses sont disposées perpendiculairement à l'axe des mitochondries. *m* = matrice, *mi* = membrane mitochondriale interne. $\times 45.000$.
- Figs. 8-9. — Localisation de la cytochrome oxydase dans les spermatozoïdes de Pourpre. Technique de Seligman et coll. au DAB cytochrome *c* tetroxyde d'osmium.
- Fig. 8. — Coupe oblique de spermatozoïde incubé dans le milieu témoin dépourvu de cytochrome *c*. $\times 45.000$.
- Fig. 9. — Coupe oblique de spermatozoïde incubé dans le milieu au DAB cytochrome *c*. Les dépôts de noir d'osmium se localisent à la surface de la membrane interne (flèches). $\times 45.000$.
- Fig. 10 et 11. — Paludine — Spermatozoïdes coupés obliquement. Dans le manchon mitochondrial périflagellaire, les mitochondries, réunies par leurs membranes externes (*me*), gardent leur individualité. Les crêtes nombreuses sont toutes issues de la face périflagellaire de la membrane interne (*mi*) (Fig. 11, flèches.). Elles constituent des disques disposés perpendiculairement au grand axe des mitochondries, séparés par des disques matriciels. $\times 45.000$.
- Fig. 12 à 21. — Pulmonés.
- Fig. 12. — Escargot. Jeune spermatide dans laquelle on remarque plusieurs types de mitochondries: des mitochondries banales (*M*₁) semblables à celles des spermatocytes, des mitochondries allongées (*M*₂) qui présentent une crête centrale dilatée. Son contenu clair correspond à la pseudomatrice (*p*) et renferme des fibrilles (flèches) de 70 à 90 Å de diamètre. La matrice (*m*) condensée constitue un manchon qui entoure cette crête dilatée. $\times 45.000$.
- Fig. 13. — Spermatide d'Escargot. Les mitochondries allongées (*M*₂) sont enroulées autour du flagelle. Le contenu de la pseudomatrice s'est modifié, les fibrilles ne sont plus visibles, mais on trouve des amas d'un matériel finement granulaire. $\times 25.000$.
- Fig. 14. — Dans cette spermatide d'Escargot plus âgée, les mitochondries enroulées autour du flagelle se fusionnent. $\times 60.000$.
- me* = membrane mitochondriale externe, *mi* = membrane mitochondriale interne, *c* = crête dilatée renfermant des amas d'un matériel finement granulaire, *m* = matrice.
- Fig. 15 à 16. — Spermatozoïde d'Escargot en cours de maturation. Coupes transversales de la région antérieure de la pièce intermédiaire.
- Fig. 15. — Au sein de la pseudomatrice 2 rangées concentriques de globules d'un diamètre de 90 Å (flèches) se sont organisées le long de la membrane mitochondriale externe (*me*) $\times 45.000$.
- mi* = membrane mitochondriale interne, *m* = matrice, *t* = microtubules.
- Fig. 16. — A un stade plus évolué, les globules remplissent tout le volume pseudomatriciel et constituent un cristal. Celui-ci enserre, le flagelle, le compartiment matriciel, (*m*) limité par ce qui subsiste de la membrane mitochondriale interne (*mi*), et dans la région antérieure un compartiment rempli de glycogène dans le spermatozoïde mature. $\times 45.000$.

Fig. 17. — Cette spermatide d'Escargot montre que des mitochondries (*M*) du cytoplasme résiduel renferment des globules (flèches) identiques à ceux du cristal de la pièce intermédiaire. (P.I.).

me = membrane mitochondriale externe, *mi* = membrane mitochondriale interne, *m* = matrice, *p* = pseudomatrice.

Fig. 18, 19, 20. — Localisation de la cytochrome oxydase au cours de la spermatogenèse de l'Escargot. Technique de Seligman et coll. au DAB cytochrome *c* tetroxyde d'osmium.

Fig. 18. — Coupe de spermatide incubé dans le milieu de Seligman. Dans la pièce intermédiaire, les dépôts se localisent au niveau du cristal (flèches). Dans les mitochondries du cytoplasme résiduel, ils se trouvent dans la pseudomatrice (*p*). $\times 45.000$.

Fig. 19. — Mitochondrie de spermatocyte incubé dans le milieu de Seligman. Les dépôts de noir d'osmium se localisent à la surface des crêtes (flèches). $\times 45.000$.

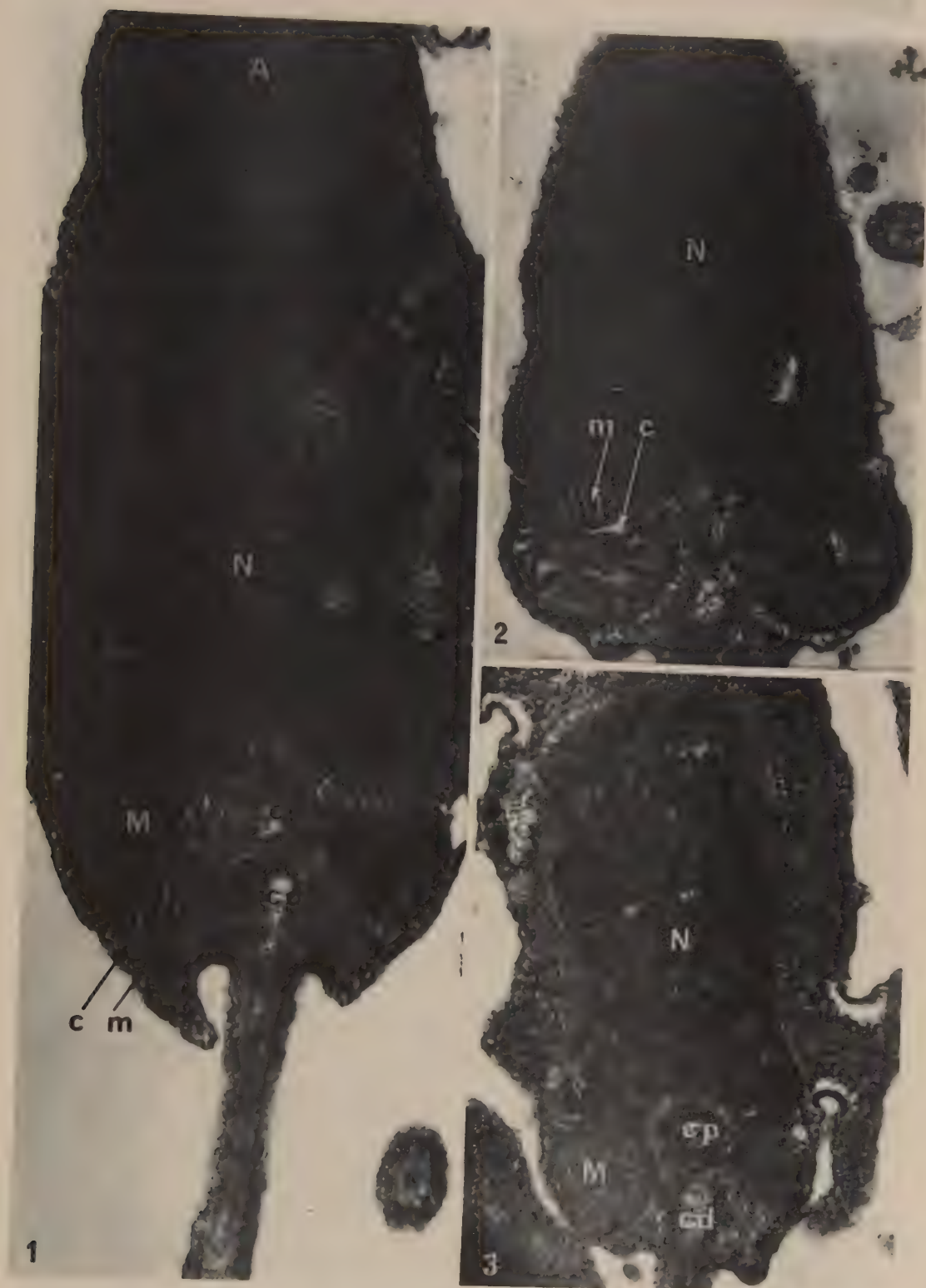
Fig. 20. — Spermatozoïdes incubés dans le milieu de Seligman coupés transversalement. Le cristal dans la pièce intermédiaire est, recouvert de noir d'osmium. $\times 45.000$

Fig. 21. — Limnée. Coupes transversales de spermatozoïdes. $\times 30.000$.

a. coupe de la région antérieure de la pièce intermédiaire montrant la surface du cristal sculptée de 7 hélices. Celles-ci correspondent aux canaux creusés dans le cristal. L'un renferme le compartiment matriciel (*m*) et présente 4 digitations; 2 autres contiennent un matériel cristallin et du glycogène (flèches).

b. coupe de la région médiane de la pièce intermédiaire, les sculptures de la surface du cristal s'estompent.

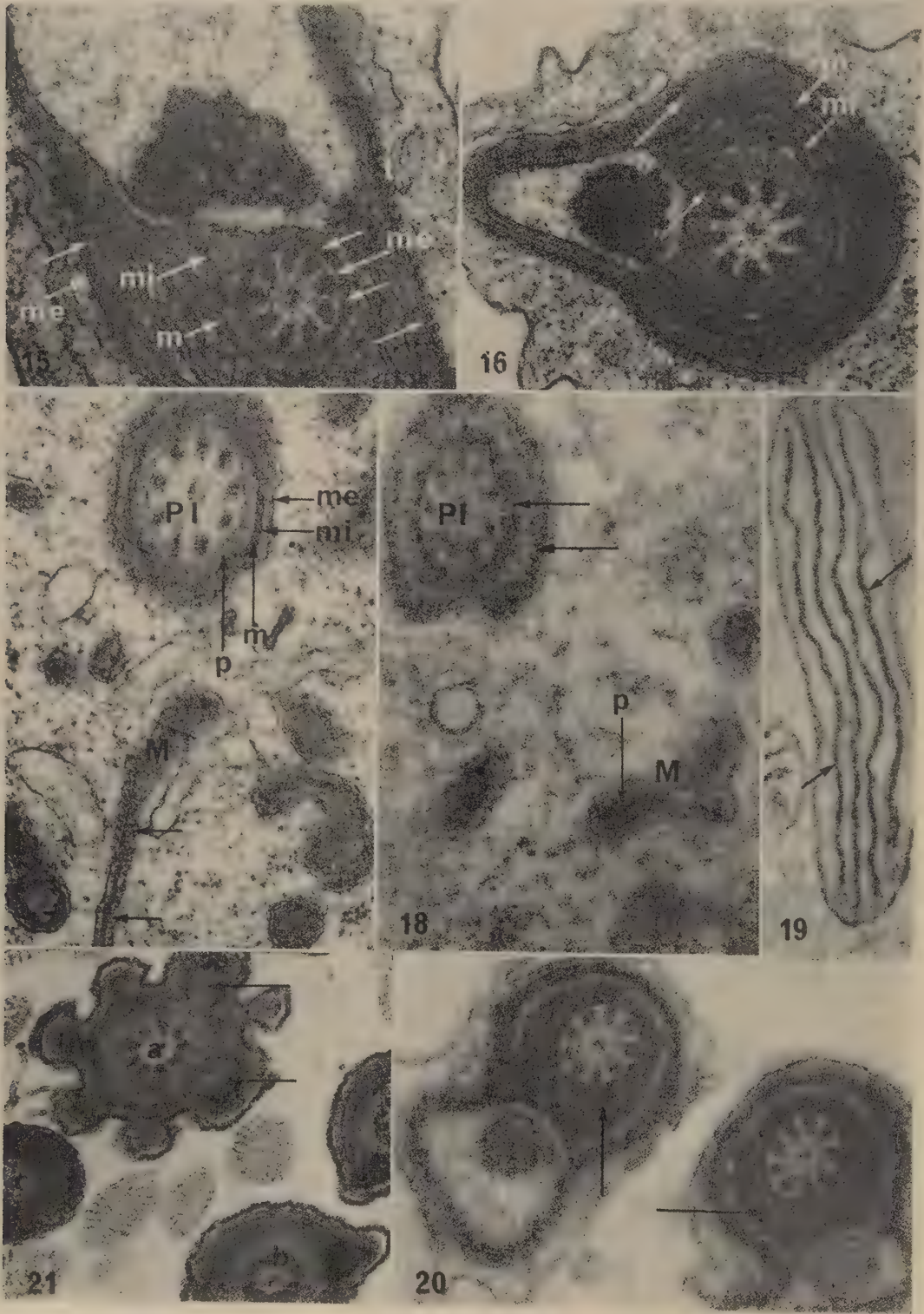
c. coupe de la région caudale remplie de glycogène périflagellaire.





P. PERSONNE et W. A. ANDERSON *Étude comparée des évolutions mitochondriales au cours
la spermatogenèse chez quelques gastéropodes.*





THE CYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF GLYCOLYTIC AND OXIDATIVE ENZYMES WITHIN MITOCHONDRIA OF SPERMATOOZOA OF SOME PULMONATE GASTROPODS¹

WINSTON A. ANDERSON AND PAUL PERSONNE

Laboratory of Human Reproduction and Reproductive Biology and the Department of Anatomy, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, Laboratoire de Biologie Animale, Faculté des Sciences, 80 Amiens, France, and Laboratoire de Biologie Cellulaire 4, Faculté des Sciences, 91 Orsay, France

Received for publication June 2, 1970

In this electron microscopic cytochemical study, the periodic acid-thiosemicarbazide-silver proteinate procedure was used to demonstrate glycogen stores within the mitochondrial derivative of sperm of pulmonate gastropods. In the presence of phenazine methosulfate and tetrazolium salt, enzymatic activity for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase is shown in the matrix and in the compartment containing glycogen, but in the absence of phenazine methosulfate, tetrazolium reductase activity in the matrix is emphasized. Activity for NADH₂-tetrazolium reductase and succinate dehydrogenase is also demonstrated in the matrix. Using 3,3'-diaminobenzidine tetra-HCl, cytochrome c oxidase activity is shown in the paracrystalline mitochondrial structure. The interrelation between glycolytic and oxidative pathways in this highly compartmentalized mitochondrion is considered.

Glycogen storage is a widespread phenomenon among spermatozoa of several invertebrate and vertebrate species (2). In gastropod molluscs, for instance, glycogen is stored within the mitochondria of spermatozoa. Presumably, glycogen serves as a source of energy for cellular metabolism. This implies the existence of enzyme systems that catalyze glycogen anabolism and catabolism under aerobic and anaerobic conditions. Indeed, the presence of phosphorylase (19) and of glucose 6-phosphatase activity in glycogen-containing mitochondria (1, 3) indicates the existence of functional pathways of glycolysis within these cells. In this investigation therefore, electron microscopic cytochemical procedures are used to localize two glycolytic dehydrogenases within mitochondria of spermatozoa. The enzymes occur within the matrix compartment in close proximity to the glycogen granules. The interrelations between glycolytic and oxidative pathways in these highly compartmentalized organelles are also considered in terms of spermatozoan metabolism, motility and storage.

¹ This work was supported in part by Grants HD-02344 from the Institute of General Medical Sciences, National Institutes of Health, and ERA-174 from the Centre National de la Recherche Scientifique, France.

MATERIALS AND METHODS

Preparative techniques for electron microscopic cytochemistry: Small pieces of ovotestis (approximately 1–2 mm²) and spermatozoa that were isolated from the hermaphroditic duct of *Otala lactea*, *Planorbis corneus*, *Helisoma anceps* and *Helix aspera* were used in these experiments. The tissues were fixed for 5–60 min at room temperature in one of the following solutions: (a) 2% depolymerized paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.7, (b) 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) that contained 5% sucrose and (c) 4% depolymerized paraformaldehyde and 5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (12). After fixation the tissues were rinsed for 1–8 hr in respective buffers and then incubated for enzyme activity. If unfixed tissues were used, samples incubated for cytochemical reactions were subsequently fixed in the formaldehyde-glutaraldehyde mixture. All samples were postfixed in 2% osmium tetroxide solution in distilled water. They were rapidly dehydrated through acetone-water solutions and embedded in Epon or in Epon-Araldite mixture (8 volumes Araldite 6005, 10 volumes Epon 812, 24 volumes DDSA, using 2% DMP-30 as activator). Thin sections cut with glass or diamond knives were examined with a Siemens Elmiskop 1 electron microscope. Some sections were unstained, while

others were stained for 30–60 sec in a lead citrate solution (25).

Demonstration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity: The incubation medium was modified from the procedure according to Fahimi and Karnovsky (9) and contained: 10 mg nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), 2 mg phenazine methosulfate (PMS), 4 mg nitro blue tetrazolium (NBT) or tetranitro blue tetrazolium (TNBT), 2 mg ethylenediaminetetraacetate (EDTA), 0.5 ml DL-glyceraldehyde 3-phosphoric acid (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.) and 5–10 ml phosphate buffer at pH 7.2. In some experiments PMS was omitted from the medium.

Control experiments involved the incubation of tissues in substrate-free medium or the preincubation of samples in 0.2 M phosphate buffer containing 1×10^{-4} sodium iodoacetate. As an additional control, samples were incubated in medium containing PMS and substrate but lacking tetrazolium salts.

All incubations were performed in the dark to prevent photooxidation of PMS. Samples were incubated at intervals from 5–60 min at 37°C.

Demonstration of lactate dehydrogenase (LDH) activity: The medium prepared according to Fahimi and Karnovsky (9) contained 4 ml TNBT (2 mg/ml), 1 ml NAD (10 mg/ml), 1 ml phenazine methosulfate (2 mg/ml) and 190 mg lithium lactate. The final volume was adjusted to 10 ml with 0.2 M Tris buffer at pH 7.2. Samples were incubated in the dark at 37°C at intervals from 5–60 min.

Control samples were incubated in substrate-free medium or preincubated in 10^{-3} N iodine solution in 0.2 M Tris buffer at pH 7.2. Tissues were then rinsed in Tris and incubated in complete medium with or without iodine.

Demonstration of NADH₂-tetrazolium reductase and succinic dehydrogenase (SDH) activity: The procedures according to Fahimi and Karnovsky (9) and Seligman *et al.* (23) were used to demonstrate NADH₂-tetrazolium reductase activity. The respective media contained: (a) 5 mg NADH₂, 4 mg TNBT and 2.5 ml Tris buffer at pH 7.2, or (b) 5 mg NADH₂, 0.75 g sucrose, 5 ml Tris buffer (pH 7.2) and 5 ml 0.1% thiocarbamyl-NBT (TC-NBT) in distilled water.

Samples were incubated from 10–60 min at 37°C in complete darkness. In order to obtain maximal enzyme reaction product with the osmiophilic ditetrazolium salt (TC-NBT), postosmication was performed at 37°C or at 60°C.

The procedure according to Seligman *et al.* (23) was used to show SDH activity. The incubation medium contained 5 ml 0.1 M sodium succinate in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), 5 ml 0.1% TC-

NBT in distilled water and 0.75 g sucrose. Control samples were incubated in medium lacking sodium succinate or in medium containing 75 mg/ml sodium malonate.

Demonstration of cytochrome c oxidase activity: The medium according to Seligman *et al.* (22) was employed. It contained 10 mg 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 10 ml 0.15 M phosphate buffer (pH 7.2) and 750 mg sucrose. Catalase (20 µg/ml) was added to the medium to prevent the accumulation of H₂O₂. In some experiments 12 mg cytochrome c (type II, Sigma) were included. Control samples were incubated in medium containing 1 mg KCN/ml. Both experimental and control samples were incubated for 20–40 min at 37°C.

Demonstration of glycogen in thin sections: Thiery's (24) modification of the method of Seligman *et al.* (21) for glycogen was used to demonstrate polysaccharides in thin sections of tissues prepared for electron microscopy. After periodic acid oxidation for 30 min, thin sections were treated with thiosemicarbazide and silver proteinate solutions for times and under conditions designated by Thiery (24) and Anderson and Personne (2).

OBSERVATIONS

The localization of glycogen in mitochondrial derivatives: Significant amounts of glycogen are present within mitochondrial derivatives of spermatozoa of all pulmonate gastropods examined (2, 5, 20). The glycogen granules appear usually as 300-Å β-particles, although rosettes of α-particles (nomenclature according to Drochmans (7), 1962) are observed in mature spermatozoa. The particles are moderately stained with lead citrate and are intensely stained after treatment with the periodic acid-thiosemicarbazide-silver proteinate procedure. In spermatozoa of *Otala*, for example (Fig. 1), the opaque deposits of glycogen completely fill a single compartment encased by the nearly crystalline mitochondrial derivative. This glycogen compartment, named the major helix by André (4), is bounded by a unit membrane and is somewhat set apart from the other compartments of the middle piece. Depending upon the species, one or more glycogen compartments are seen to run a helical course within the middle piece. The granules are extractable with α-amylase solutions and when appropriately stained a proteinaceous coat is seen to surround each particle (17).

Demonstration of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPD) activity: Optimal enzymatic activity for GAPD was obtained after brief fixation (5–15 min) in either 2% de-

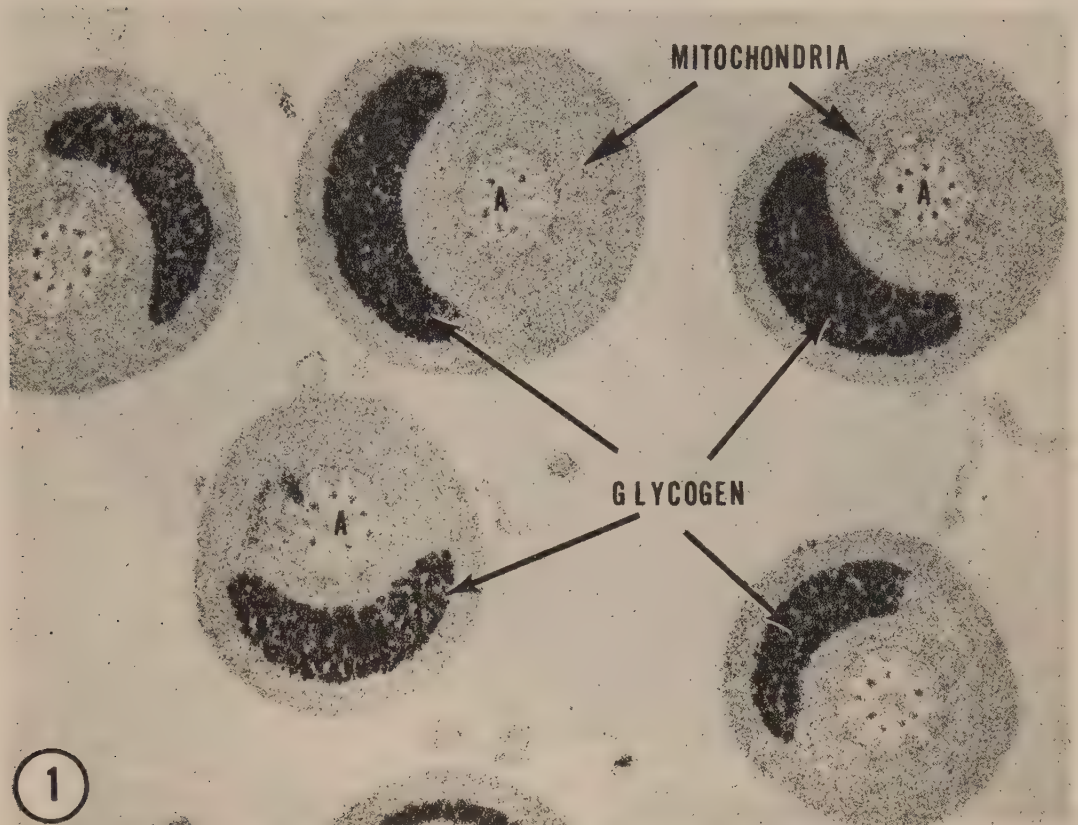


Fig. 1 After treatment of thin sections with the periodic acid-thiosemicarbazide-silver proteinate procedure, opaque deposits of glycogen are observed within the major compartment of spermatozoa of *Otala*. The near crystalline mitochondrial derivative completely encases the glycogen compartment. A, axoneme. $\times 60,000$.

polymerized paraformaldehyde or 2% glutaraldehyde solutions. Although the reaction rate was fast when unfixed tissues were used, the enzyme end product generally diffused from the tissue during dehydration. However, some enzyme reaction product may be retained if these spermatozoa were doubly fixed in glutaraldehyde and osmium tetroxide solutions after incubation. Of the three tetrazolium salts tried (NBT, T-NBT, TC-NBT), TNBT and TC-NBT showed tetrazolium reductase activity best.

Spermatozoa of *Otala* are intensely positive for GAPD activity. At the light microscopic level, the blue staining produced by the enzymatic reduction of the tetrazolium salt appears only within the middle piece. The reaction was positive when sperm were incubated in medium containing or lacking PMS, but sperm were unstained in the absence of substrate or when enzymatic activity was inhibited by iodoacetate.

Since light microscopy lacks the resolution to localize the formazan precisely, similarly treated

spermatozoa were examined by electron microscopy. After brief fixation in glutaraldehyde (5–10 min) and incubation in complete medium containing TNBT and PMS, formazan deposits appear only in the matrix and glycogen compartments of the mitochondrion (Fig. 2). The opaque formazan deposits obscure the details of the glycogen compartment. In the absence of PMS, enzyme activity appears in the matrix but is absent from the glycogen compartment. Iodoacetate is known to inhibit GAPD activity. Hence, spermatozoa that were preincubated in medium containing iodoacetate show no enzymatic activity (Fig. 3). In addition, spermatozoa incubated in medium containing substrate and PMS but lacking tetrazolium salt are unstained.

Demonstration of LDH activity: Spermatozoa of fresh water gastropods (*Lymnaea*, *Planorbis*, *Helisoma*) have distinct glycogen, matrix and crystalline compartments (Fig. 4), although the dimensions and arrangement of these compartments vary somewhat from those of terrestrial

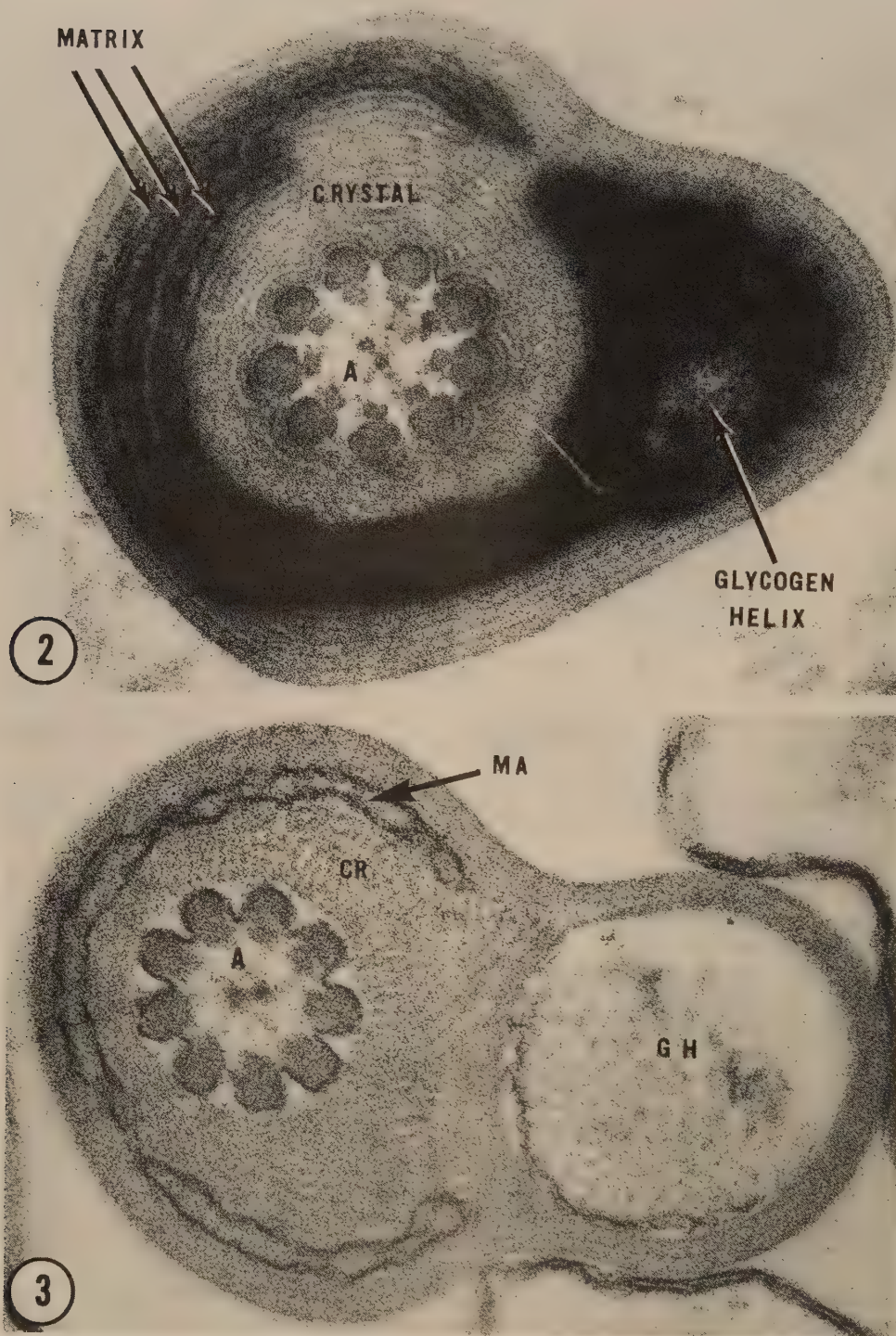


FIG. 2. When spermatozoa of *Otala* are incubated in medium containing PMS, TNBT and glyceraldehyde-3-phosphoric acid, opaque formazan deposits representing glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase activity appear to the matrix and in the glycogen compartment of the mitochondrial derivative. The underlying glycogen granules are not visible. $\times 90,000$.

FIG. 3. In this micrograph a control specimen that was preincubated in medium containing iodoacetate is shown. Formazan deposits are absent from the matrix (MA), glycogen (GH) and crystalline (CR) compartments of the mitochondrion. A, axoneme. $\times 90,000$.

species (*Otala*) described above (Figs. 1-3). The middle piece of sperm of all species studied shows intense LDH activity. In the absence of PMS, LDH activity is limited to the matrix compartments of the mitochondrion (Fig. 5). Only in the presence of PMS does the enzyme reaction product appear within the glycogen compartment as well. Spermatozoa incubated in substrate-free medium containing PMS or in medium containing iodine are unreactive for LDH. Iodine is known to inhibit LDH activity.

Démonstration of SDH and NADH₂-tetrazolium reductase activity: Spermatozoa incubated in medium containing succinate-TC-NBT or in NADH₂-TC-NBT are intensely reactive for SDH and NADH₂-tetrazolium reductase activity respectively. These enzymes resist brief aldehyde fixation (5-10 min) but enzymatic activity is totally inhibited after fixation for longer periods. After brief fixation in 2% depolymerized para-formaldehyde, SDH and NADH₂-tetrazolium reductase activity appear only in the matrix compartments of the mitochondrion (Figs. 6 and 7). Even when PMS is added to the medium, deposits of osmium black are never revealed within the glycogen compartment. In the absence of succinate or NADH₂ spermatozoa are unreactive. A previous report by Personne and Anderson (18) fully established the existence of citric acid cycle dehydrogenases within the matrix of mitochondria of sperm of other pulmonate gastropods. Furthermore, experiments using the copper ferricyanide technique for demonstrating the succinate- and NADH₂-ferricyanide reductases (13) support the observation that the Krebs cycle enzymes occupy the matrix compartment of these mitochondrial derivatives.

Demonstration of cytochrome c oxidase activity: The major component of the mitochondrial derivative is a nearly crystalline structure composed of 90-Å globular subunits (5, 17). During spermiogenesis, the internal membranes of typical mitochondria transform into the components of this paracrystalline structure.²

Using the osmiophilic compound 3,3'-diaminobenzidine tetra-HCl, activity for cytochrome c oxidase is localized on the internal membranes, in the intracrystal space and in the outer compartment of mitochondria of epithelial cells (Fig. 8). In spermatids, enzyme reaction product for cytochrome c oxidase activity is shown on the internal membranes and in the intracrystal space of these typical mitochondria (Fig. 9) and in the forming middle piece (Fig. 10). In mature spermatozoa, only the crystalline compartment is positive for cytochrome c oxidase activity (Fig. 11).

DISCUSSION

It is well established that the Embden-Meyerhof pathway is of central importance in the production of adenosine triphosphate (ATP) under anaerobic conditions. But even under aerobic conditions glycolysis provides ATP and/or glycolytic end products that serve as oxidative sources of energy. In all previously documented cases however, polysaccharide reserves that provide the substrates for glycolysis are localized in the cytoplasm while the Embden-Meyerhof enzymes occur within the supernatant fraction of tissue homogenates. Normally, oxidizable end products of glycolysis, *viz.*, pyruvate, diffuse from the groundplasm into the mitochondria where they are utilized.

The discovery of significant reserves of glycogen within mitochondria presents new problems in understanding the physiology of these organelles. The most obvious implication is that they possess the enzymes involved in glycogen metabolism. An active phosphorylase which under specified conditions catalyzes the *in vivo* synthesis of glycogen is localized within the glycogen compartment (19). Under normal conditions however, phosphorylase presumably catalyzes the initial phases of glycolysis. From the evidence presented here it seems clear that these mitochondria also contain the major glycolytic enzymes. The GAPD reaction, for example, provides the first high energy intermediate from which glycolytic ATP is formed. Moreover, although LDH is a peripheral enzyme of glycolysis it may have relevance to the metabolism of these spermatozoa since, under anaerobic conditions, it provides the mechanism for the oxidation of reduced NAD without the involvement of molecular oxygen. The NADH formed via the oxidative step of glycolysis can be reoxidized either by pyruvate to lactate with the participation of LDH or by the respiratory chain. Reoxidation of NADH by pyruvate is a metabolic necessity for spermatozoa under anaerobic conditions. It may be of great importance, therefore, that both GAPD and LDH have identical sites within mitochondria of these spermatozoa.

Phenazine methosulfate appears to play a significant role in the demonstration of glycolytic dehydrogenases. Formazan deposits appear within the glycogen compartment only when PMS is included in the medium. Presumably, PMS acting as an intermediate electron carrier allows the

² P. Personne, unpublished data.

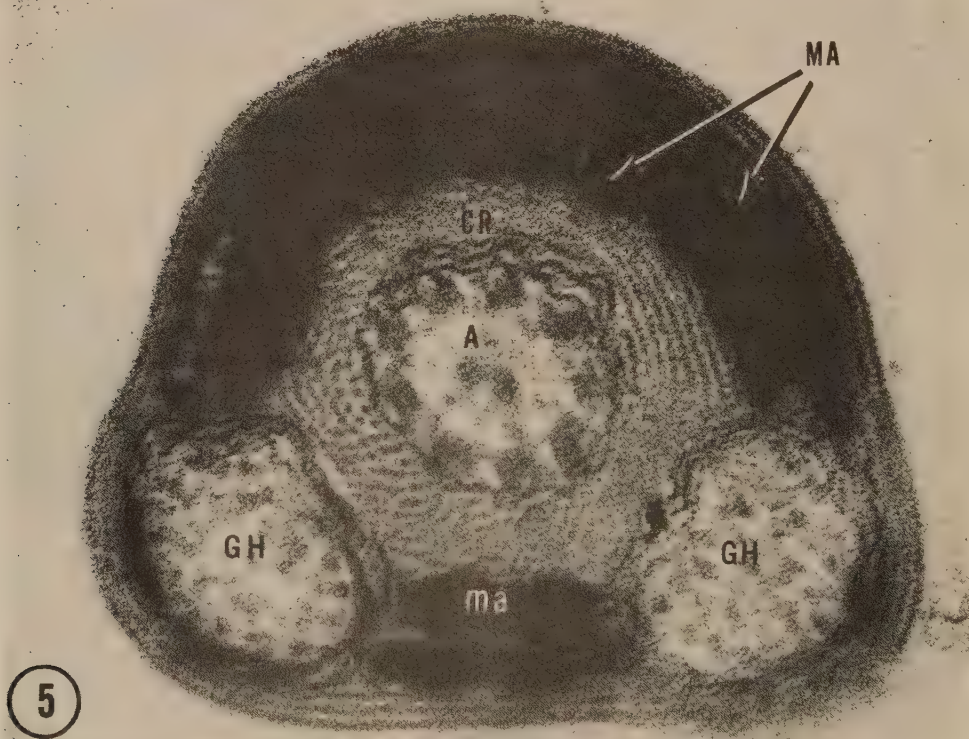
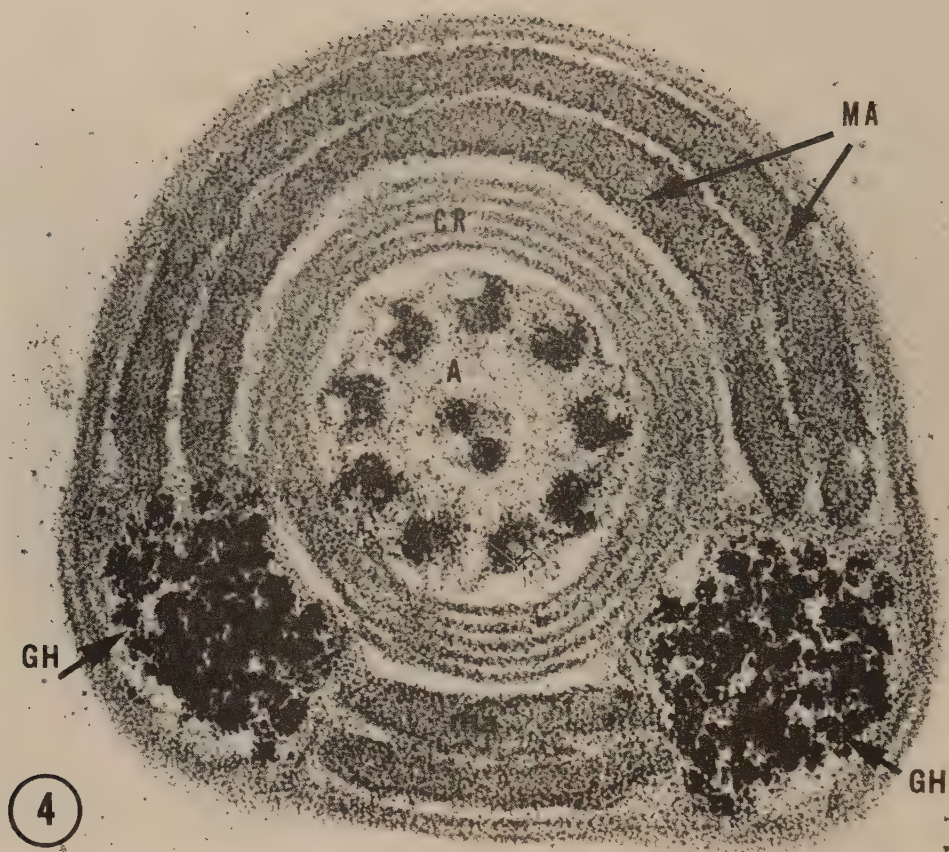
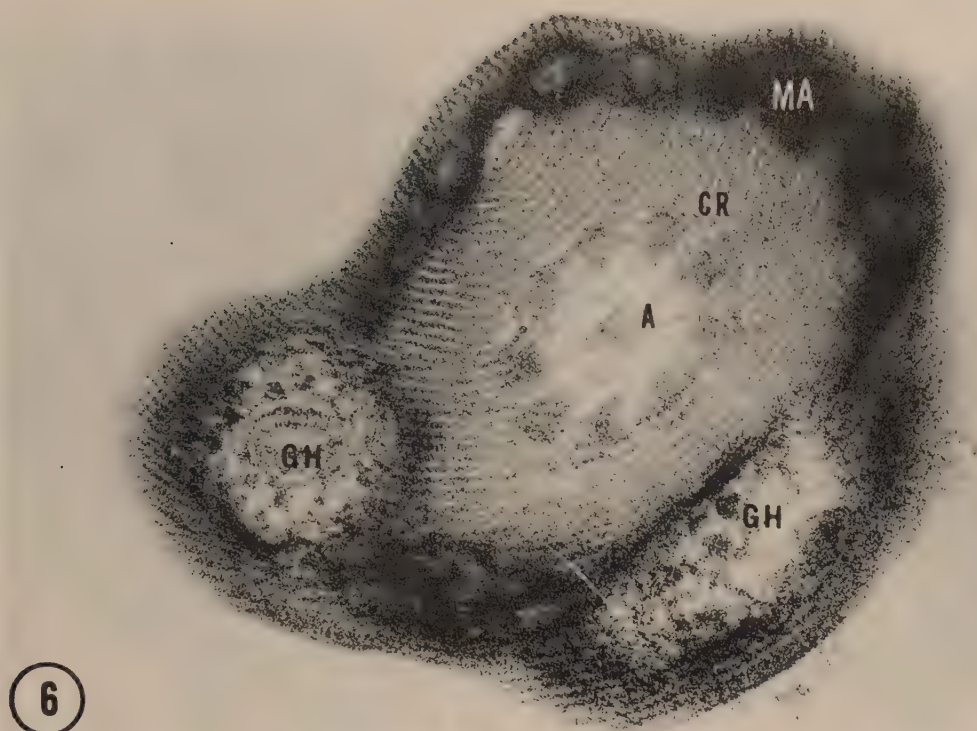


FIG. 4 A transverse section through the middle piece of a spermatozoon of *Helisoma* is illustrated here. Distinct matrix (MA), crystalline (CR) and glycogen compartments (GH) are visible. After the periodic acid-thiosemicarbazide-silver proteinate treatment the glycogen particles are intensely stained. $\times 120,000$.

FIG. 5 When sperm are incubated in medium containing lactate and TC-NBT, but lacking PMS, deposits of osmium black indicating LDH-tetrazolium reductase activity appear only in the matrix compartments (ma; MA) $\times 100,000$.



6



7

FIG. 6. NADH_2 -tetrazolium reductase activity is shown in the matrix compartment in sperm of *Helisoma*. $\times 120,000$.

FIG. 7. Opaque deposits of osmium black indicating SDH activity appear in the matrix compartment of sperm of *Helisoma*. $\times 120,000$.



FIG. 8 Mitochondria of epithelial cells lining the hermaphroditic duct are intensely positive for cytochrome *c* oxidase activity. $\times 30,000$.

FIG. 9. In this micrograph, cytochrome *c* oxidase activity (arrows) is shown in typical mitochondria of a spermatid of *Olala*. The reaction product is seen on the internal membranes and within the intra-cristal space of the mitochondria. $\times 30,000$.

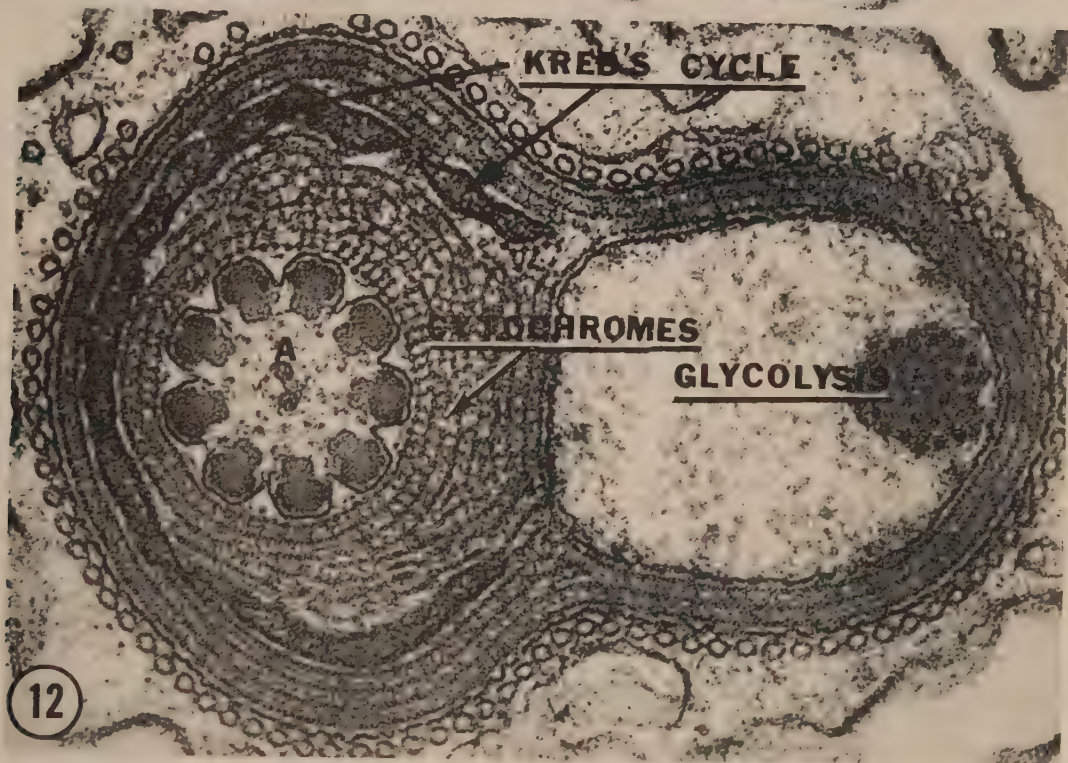
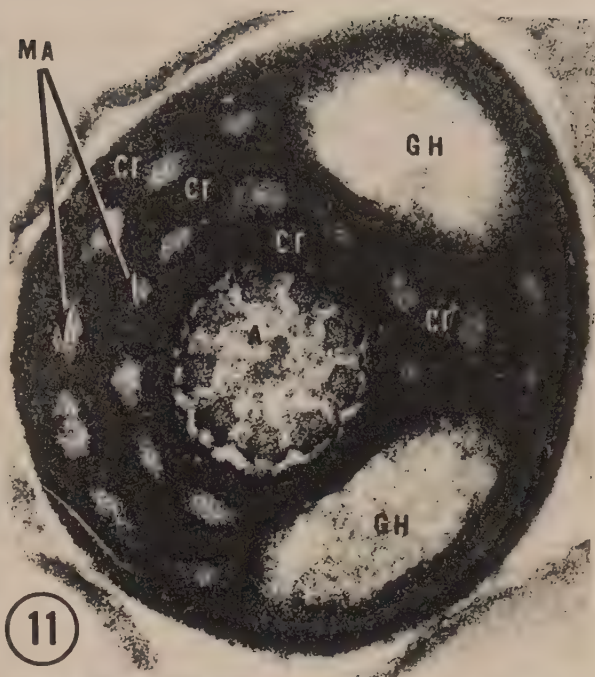
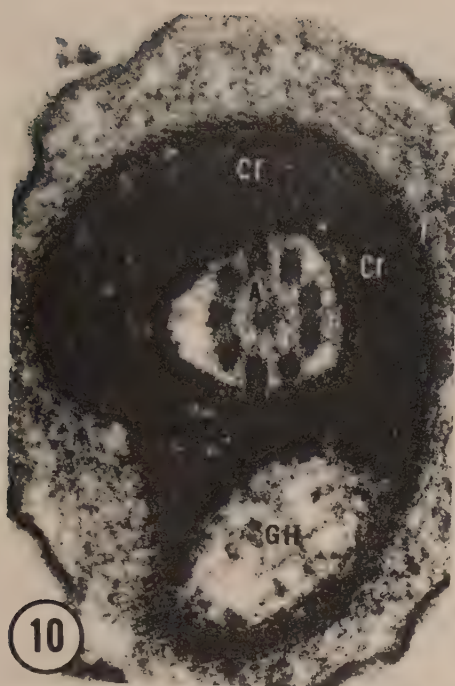


FIG. 10. In a more differentiated spermatid of *Otala* cytochrome *c* oxidase activity appears on internal membranes and within the intracristal space (cr) of mitochondrial components surrounding the axoneme (A) and the glycogen helix (GH). $\times 60,000$.

FIG. 11. A transverse section through a mature spermatozoon of *Lymnaea* is shown. Cytochrome *c* oxidase activity is present on the near crystalline components (cr), while the matrix (MA), axoneme (A) and glycogen helix (GH) are unstained. $\times 90,000$.

FIG. 12. The possible relationship between glycolytic, oxidative and respiratory enzymatic systems within the mitochondrial derivative of pulmonate gastropods is indicated with labels on this micrograph. $\times 110,000$.

demonstration of specific dehydrogenase activity by bypassing the NAD-linked tetrazolium reductase (diaphorase) system (9, 11). In the absence of PMS the tetrazolium reductase system in the matrix is emphasized.

On the basis of biochemical analyses glycolytic dehydrogenases have been localized within the supernatant fraction of tissue homogenates (6, 16). Cytochemical studies show both GAPD and LDH activity in the sarcoplasmic reticulum and in the matrix of mitochondria of white skeletal muscle cells (9). In glycogen-containing mitochondria these enzymes reside within the matrix but in the glycogen compartment as well. However, the exact relationship of enzymes to glycogen granules remains enigmatic. It has been suggested that the enzymes compose, in part, the proteinaceous coat surrounding each particle (5, 17). Support of this hypothesis is derived from the fact that an amylophosphorylase is firmly fixed to isolated glycogen particles (26).

In mitochondria of the spermatozoa examined in this study the matrix compartment contains the citric acid cycle enzymes (18). These findings tend to support the biochemical data on typical mitochondria in which the soluble oxidative enzymes are present in the matrix (8, 14). Our findings do not support suggestions that citric acid cycle enzymes are localized within the outer mitochondrial membrane (10). In view of these opposing viewpoints, it is obvious that the topographical relationship of the citric acid cycle enzymes within typical mitochondria has not yet been precisely determined.

All of the enzymes of the respiratory chain are present and operative within the mitochondria of spermatozoa of pulmonate gastropods.³ However, whereas in typical mitochondria both SDH and cytochrome *c* oxidase activity appear to have nearly identical loci on the internal membranes (15, 22), in mitochondria of these spermatozoa SDH activity appears in the matrix and is set apart from the DAB-positive subunits of the paracrystalline structure. In addition to cytochrome *c* oxidase activity, other components of the respiratory chain are perhaps shown by the DAB reaction.

The extreme chemical and structural compartmentation of these mitochondria may be interpreted as mechanisms to provide the orderly

operation of the metabolic sequences of glycolysis and the citric acid cycle. The assembled data suggest that glycolytic processes occur mainly within the glycogen compartment and the matrix compartment (Fig. 12). End products of glycolysis, *viz.*, pyruvate, and ATP may be transferred to the matrix compartment where they are oxidized by the citric acid cycle intermediates. Hydrogen or electrons are then transferred down the respiratory chain components which compose the paracrystalline structure. ATP produced by oxidative phosphorylation may then diffuse toward the axoneme where it is utilized in energy production.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Dr. Don Fawcett and Dr. J.-P. Revel, Department of Anatomy, Harvard Medical School, Boston, for reading the manuscript and Dr. Morris Karnovsky, Department of Pathology, Harvard Medical School, for his advice on this subject.

REFERENCES

1. Anderson, W. A.: Cytochemistry of sea urchin gametes. I. Intramitochondrial localization of glycogen, glucose-6-phosphatase and adenosine triphosphatase activity in spermatozoa of *Paracentrotus lividus*. *J. Ultrastruct. Res.* 24: 398, 1968.
2. Anderson, W. A. and Personne, P.: The localization of glycogen in the spermatozoa of various invertebrate and vertebrate species. *J. Cell Biol.* 44: 29, 1970.
3. Anderson, W. A., Personne, P. and André, J.: Chemical compartmentalization in *Helix* spermatozoa. *J. Microsc.* 7: 367, 1968.
4. André, J.: Contribution à la connaissance du chondriome. Étude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogenèse. *J. Ultrastruct. Res.*, suppl. 3, 1, 1962.
5. André, J.: Quelques données récentes sur la structure et la physiologie des mitochondries: glycogène, particules élémentaires, acides nucléiques. *Arch. Biol. (Liege)* 76: 277, 1965.
6. de Duve, C., Wattiaux, R. and Baudhuin, P.: Distribution of enzymes between subcellular fractions in animal tissues. *Advance Enzymol.* 24: 291, 1962.
7. Drochmans, P.: Morphologie du glycogène. *J. Ultrastruct. Res.* 6: 141, 1962.
8. Ernster, L.: In *Proceedings of the Round Table Discussion on Mitochondrial Structure and Compartmentation*, edited by E. Quagliariello, S. Papa, E. C. Slater and J. M. Tager. Adriatica Editrice, Bari, Italy, 1967, pp. 90-118.
9. Fahimi, D. and Karnovsky, M.: Cytochemical localization of two glycolytic dehydrogenases in white skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 29: 113, 1966.

³ C. Ritter and J. André, unpublished data (Cytochromes in sperm of *Helix*).

10. Green, D.: In *Proceedings of the Round Table Discussion on Mitochondrial Structure and Compartmentation*, edited by E. Quagliariello, S. Papa, E. C. Slater and J. M. Tager. Adriatica Editrice, Bari, Italy, 1967. pp. 90-118.
11. Himmelhoch, S. R. and Karnovsky, M. J.: The histochemical demonstration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9: 573, 1961.
12. Karnovsky, M. J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27: 137A, 1965.
13. Kerpel-Fronius, S. and Hajos, F.: The use of ferricyanide for the light and electron microscope demonstration of succinic dehydrogenase activity. *Histochemie* 14: 343, 1968.
14. Lehninger, A. L.: *The Mitochondrion*. W. A. Benjamin Inc., New York, 1964.
15. Ogawa, K. and Barnett, R. J.: Electron microscopic studies of succinic dehydrogenase and dihydronicotinamide-adenine dinucleotide diaphorase activities. *J. Ultrastruct. Res.* 12: 488, 1965.
16. Paigen, K. and Wenner, C. E.: The intracellular location of the glycolytic dehydrogenases in liver hepatoma. *Arch. Biochem. Biophys.* 97: 213, 1962.
17. Personne, P.: Étude cytochimique du derive mitochondrial du spermatozoïde de la Testacelle: recherche des protéines et des lipides. *J. Micr.* 4: 627, 1965.
18. Personne, P. and Anderson, W. A.: Compartimentage des activités enzymatiques dans le spermatozoïde de la certains mollusques gastéropodes. I. Localisation des deshydrogenases. *J. Cell Sci.* 4: 693, 1969.
19. Personne, P. and Anderson, W. A.: Localisation mitochondriale d'enzymes liées au métabolisme du glycogène dans le spermatozoïde de l'escargot. *J. Cell Biol.* 44: 20, 1970.
20. Personne, P. and André, J.: Existence de glycogène mitochondrial dans le spermatozoïde de la Testacelle. *J. Micr.* 3: 643, 1964.
21. Seligman, A. M., Hanker, J. S., Wasserkrug, H., Dmochowski, H. and Katzoff, L. I.: Histochemical demonstration of some oxidized macromolecules with thiosemicarbohydrazide (TCH) or thiosemicarbazide (TSC) and osmium tetroxide. *J. Histochem. Cytochem.* 13: 629, 1965.
22. Seligman, A. M., Karnovsky, M. J., Wasserkrug, H. L. and Hanker, J. S.: Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). *J. Cell Biol.* 38: 1, 1968.
23. Seligman, A. M., Ueno, H., Morizono, Y., Wasserkrug, H. L., Katzoff, L. and Hanker, J. B.: Electron microscopic demonstration of dehydrogenase activity with a new osmiophilic ditetrazolium salt (TC-NBT). *J. Histochem. Cytochem.* 15: 1, 1967.
24. Thiery, J. P.: Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Micr.* 6: 987, 1967.
25. Venable, J. H. and Coggeshall, R.: A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 25: 407, 1965.
26. Wanson, J. C. and Drochmans, P.: Detection of phosphorylase with the electron microscope. In *Control of Glycogen Metabolism: Proceedings of the Fourth Symposium of the European Biochemical Societies*, Oslo, 1968 p. 169.

